

4287

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Dezember 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/76550 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 47/48**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/05254**

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juni 2000 (07.06.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
199 26 475.9 10. Juni 1999 (10.06.1999) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **KTB TUMORFORSCHUNGSGESELLSCHAFT
MBH [DE/DE];** Breisacher Strasse 117, D-79106 Freiburg
im Breisgau (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KRATZ, Felix**
[DE/DE]; Zum Abtsweingarten 19, 79241 Ihringen (DE).

(74) Anwalt: **PERREY, Ralf; Müller-Boré & Partner, Grafen-**
ger Strasse 2, D-81671 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AL, AM, AT, AU,**
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,

DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): **ARIPO-Patent (GH,**
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: **17. Mai 2001**

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: **CARRIER-DRUG CONJUGATE**

(54) Bezeichnung: **TRÄGER-PHARMAKA-KONJUGATE**

(57) Abstract: The invention relates to a carrier-drug conjugate comprising a carrier containing a polypeptide sequence having one or several cysteine radicals and a pharmakon containing a pharmaceutical and/or diagnostic active substance, a spacer molecule and a thiol binding group, whereby over 0.7 mol pharmakon per mol of cysteine radical is bound to the carrier by the thiol binding group. The invention also relates to a method for the production of said conjugate and to medicaments and diagnostic kits containing said conjugate.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Träger-Pharmaka-Konjugate, umfassend einen Träger, enthaltend eine Polypeptidsequenz mit einem oder mehreren Cystein-Resten, und ein Pharmakon, enthaltend eine pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz, ein Spacermolekül und eine thiolbindende Gruppe, wobei pro Mol Cystein-Rest mehr als 0,7 Mol Pharmakon über die thiolbindende Gruppe an den Träger gebunden sind, sowie Verfahren zu deren Herstellung und Arzneimittel und diagnostische Kits, welche die Konjugate enthalten.

WO 00/76550 A3

"Träger-Pharmaka-Konjugate"

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Träger-Pharmaka-Konjugate, sowie Verfahren zu deren Herstellung und Arzneimittel, welche die Konjugate enthalten.

Der Großteil der zur Zeit eingesetzten Pharmaka sind niedermolekulare Verbindungen und weisen nach systemischer Applikation eine hohe Plasma- sowie Gesamtclearance auf. Desweiteren dringen sie aufgrund von Diffusionsvorgängen in die Gewebestrukturen des Körpers ein und weisen in der Regel eine gleichmäßige Bioverteilung auf. Beide Eigenschaften führen dazu, daß nur geringe Mengen des Pharmakons den Wirkort erreichen und das Pharmakon aufgrund seiner Verteilung auf das gesunde Gewebe des Körpers Nebenwirkungen hervorruft. Diese Nachteile sind besonders bei solchen Pharmaka ausgeprägt, die ein hohes zytotoxisches Potential besitzen, wie etwa Zytostatika oder Immunsuppressiva.

{

Aus diesem Grund wird nach neuen Derivaten bzw. Formulierungen gesucht, die eine selektivere Therapie ermöglichen. Zu diesem Zwecke werden Chemoimmunokonjugate bzw. Protein- oder Polymerkonjugate, bestehend aus einer geeigneten Trägersubstanz und einem Pharmakon, entwickelt.

Zum Stand der Technik auf diesem Gebiet sind Polymerkonjugate zu nennen, bei denen Zytostatika an Serumproteine, Antikörper, Wachstumsfaktoren, hormon- bzw. peptidähnliche Strukturen oder an synthetische Polymere gekoppelt sind (Mägerstädt, M.: Antibody Conjugates and Malignant Disease, Library of Congress 1990; Seymour, L.W. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1992), 9, 135-187; Maeda, H.; Matsumura, Y. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1989), 6, 193-210).

Aus DE-A-41 22 210 sind Konjugate tumoraktiv r Verbindungen mit Albumin bekannt, wobei die tumoraktive Verbindung mit N-Hydroxysuccinimid und Carbodiimid aktiviert und das so erhaltene Gemisch direkt an das Trägerprotein gekoppelt wird. Nachteile dieser Konjugate liegen u.a. darin, daß sie nicht in der erforderlichen hohen Reinheit gewonnen werden können, die native Struktur des Albumins aufgrund der Herstellungsverfahren oft nicht erhalten bleibt und das stöchiometrische Verhältnis von Pharmakon zu Albumin nicht konstant und schlecht reproduzierbar ist. Desweiteren ermöglichen es diese Konjugate nicht, daß sie in geeigneter Weise im Zielgewebe bzw. in den Zielzellen freigesetzt werden können.

Daher liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, neue Träger-Pharmaka-Konjugate bereitzustellen, welche die Nachteile der im Stand der Technik bekannten Konjugate überwinden.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung gelöst.

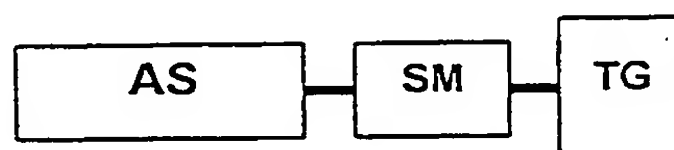
Insbesondere wird ein Träger-Pharmakon-Konjugat bereitgestellt, umfassend einen Träger, enthaltend eine Polypeptidsequenz mit einem oder mehreren Cystein-Resten, und ein Pharmakon, enthaltend eine pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz, ein Spacermolekül und eine thiolbindende Gruppe, wobei pro Mol Cystein-Rest mehr als 0,7 Mol, vorzugsweise mindestens 0,9 Mol, Pharmakon über die thiolbindende Gruppe an den Träger gebunden sind. Der Ausdruck "pharmazeutisch aktive Substanz" bedeutet, daß die betreffende Substanz entweder selbst oder nach ihrer Umsetzung durch den Stoffwechsel im jeweiligen Organismus eine pharmakologische Wirkung hervorruft und umfaßt somit auch die sich durch diese Umsetzungen ergebenden Derivate. Selbstverständlich kann die pharmazeutisch aktive Substanz ein einzelnes (beispielsweise nur als Zytostatikum) oder ein breites (beispielsweise als Zytostatikum und als Antiphlogistikum usw.) pharmakologisches Wirkspektrum aufweisen. Der Ausdruck "diagnostisch wirksame Substanz" bedeutet, daß die betreffende Substanz mittels geeigneter chemischer und/oder physikalischer Meßmethoden im Organis-

mus oder Teilen davon wie beispielsweise Zellen und/oder Flüssigkeiten wie beispielsweise dem Serum nachweisbar, vorzugsweise auch quantifizierbar ist.

Die Freisetzung der pharmazeutisch wirksamen Substanz ist bevorzugt, da in der Regel der niedermolekulare Wirkstoff mit dem Zielmolekül wechselwirken muß, um seine pharmakologische Wirksamkeit zu entfalten. Bei diagnostisch wirksamen Substanzen ist in der Regel eine Freisetzung des an das Trägermolekül gebundenen Diagnostikums nicht erforderlich, kann jedoch vorhanden sein. Erfindungsgemäß kann deshalb insbesondere eine diagnostisch wirksame Substanz zusätzlich über eine im Körper nicht spaltbare Bindung an das Spacermolekül oder direkt an die Trägermolekül-bindende Gruppe gebunden sein.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats ist der Träger natives oder rekombinantes Albumin.

Das Pharmakon bzw. das Pharmakonderivat im erfindungsgemäßen Konjugat läßt sich beispielsweise durch das folgende Schema darstellen (AS, pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz; SM, Spacermolekül; TG, thiolbindende Gruppe):



Das erfindungsgemäße Konjugat stellt eine Transport- und/oder Depotform der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz dar, die so gezielt bzw. in dosierter Form die Zielzellen bzw. das Zielgewebe des Pharmakons erreicht. Gegenüber den bisher bekannten Konjugaten können die Konjugate der vorliegenden Erfindung in einer höheren Reinheit gewonnen werden, die native Struktur des Trägers bleibt erhalten und das stöchiometrische Verhältnis von Pharmakon zu Träger ist konstant und reproduzierbar.

Gegenüber den in DE-A-41 22 210 beschriebenen Albumin-Zytostatika-Konjugata-

ten besitzt das erfindungsgemäße Konjugat weiterhin den Vorteil, daß zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und der thiolbindenden Gruppe ein Spacermolekül vorhanden ist, das so maßgeschneidert ist, daß die pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz oder ein entsprechendes aktives Derivat hiervon im Zielgewebe bzw. in den Zielzellen hydrolytisch und/oder pH-abhängig und/oder enzymatisch freigesetzt werden kann.

Träger wie beispielsweise Albumin bzw. deren Pharmaka-Konjugate weisen eine ausgesprochen lange Halbwertszeit im systemischen Kreislauf auf (bis zu 19 Tage - Peters, T. Jr. (1985): Serum albumin. *Adv. Protein. Chem.* 37, 161-245). Aufgrund einer erhöhten Permeabilität von Gefäßwänden des malignen, infizierten bzw. entzündeten Gewebes für Makromoleküle gelangt der Träger wie beispielsweise Serumalbumin bevorzugt in das Zielgewebe (Maeda, H.; Matsu-mura, Y. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1989), 6, 193-210). Dadurch kann ein an einen Träger, z.B. Albumin, gekoppelter Wirkstoff gezielter den Wirkort erreichen. Desweiteren verhindert das erfindungsgemäße Träger-Pharmakon-Konjugat, das die pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz in gesunde Gewebestrukturen des Körpers diffundiert oder über die Niere eliminiert wird bzw. diese in dem Maße schädigt wie die nicht gebundene pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz. Dadurch wird das pharmakokinetische Profil der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz verändert und verbessert, da die Wirkung der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz durch eine Anreicherung am Wirkort erhöht wird und gleichzeitig die toxischen Wirkungen auf gesunde Systeme des Körpers verringert werden.

Das Konjugat der vorliegenden Erfindung besitzt eine ausgezeichnete Wasserlöslichkeit. Desweiteren zeigt das erfindungsgemäße Konjugat *in vivo* beispielsweise eine verbesserte antitumorale Wirksamkeit gegenüber der ungebundenen pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats ist das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die

Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül hydrolytisch und/oder pH-abhängig und/oder enzymatisch spaltbar. Vorzugsweise enthält das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül mindestens eine säurelabile Bindung. Beispiele säurelabiler Bindungen sind Ester-, Acetal-, Ketal-, Imin-, Hydrazon, Carboxylhydrazon-, Sulfonylhydrazon und eine Tritylgruppe enthaltende Bindungen. Bindungen, die durch Hydrolyse unter Freisetzung der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz gespalten werden, sind beispielsweise Esterbindungen oder Metallkomplexverbindungen, wie sie bei Platin-Dicarboxylat-Komplexen vorliegen, wobei ein Diamindiaquo-Platin(II)-Komplex freigesetzt wird. Beispiele für im Körper nicht spaltbare Bindungen, die beispielsweise bei der Verknüpfung zu einer diagnostisch wirksamen Substanz vorliegen können, sind Amidbindungen, gesättigte und ungesättigte Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen oder Bindungen zwischen Kohlenstoff und einem Heteroatom, -C-X-, wobei X vorzugsweise O, N, S oder P ist.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats enthält das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül mindestens eine Peptidbindung. Vorzugsweise liegt die Peptidbindung innerhalb einer Peptidsequenz vor, welche mindestens eine Spaltsequenz einer Protease enthält. Daher kann die mindestens eine Peptidbindung durch Einfügen einer Peptidsequenz in das Spacermolekül und/oder in die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder in die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül realisiert werden, d.h. die jeweilige Verknüpfung ist eine Peptidbindung, und besteht vorzugsweise aus etwa 1 bis 30 Aminosäuren. Die Peptidsequenz ist dabei vorzugsweise auf die Substratspezifität bestimmter körpereigener Enzyme oder von Enzymen zugeschnitten, die in Mikroorganismen vorkommen bzw. von diesen gebildet werden. Dadurch wird die Peptidsequenz

oder ein Teil dieser Sequenz im Körper von den Enzymen erkannt und das Peptid gespalten.

Die Enzyme sind beispielsweise Proteasen und Peptidasen, z.B. Matrix-Metalloproteasen (MMP), Cysteinproteasen, Serinproteasen und Plasminaktivatoren, die bei Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Krebs verstärkt gebildet oder aktiviert sind, was zum exzessiven Gewebeabbau, zu Entzündungen und zur Metastasierung führt. Targetenzyme sind insbesondere MMP 2, MMP 3 und MMP 9, die als Proteasen bei den genannten pathologischen Prozessen beteiligt sind (Vassalli, J., Pepper, M.S. (1994), *Nature* 370, 14-15, Brown, P.D. (1995), *Advan. Enzyme Regul.* 35, 291-301).

Weitere Proteasen, die Targetenzyme für Konjugate der vorliegenden Erfindung darstellen, sind Cathepsine, insbesondere Cathepsin B und H, die als Schlüsselenzyme bei entzündlichen und malignen Erkrankungen identifiziert worden sind (T. T. Lah et al. (1998), *Biol. Chem.* 379, 125-301).

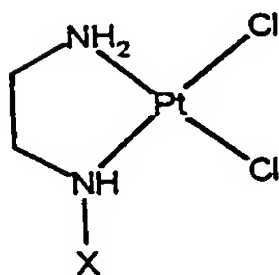
Gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats enthält das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül mindestens eine Bindung, die enzymatisch spaltbar ist, aber nicht aus einer Peptidbindung besteht. Beispiele sind Carbamatbindungen, bei denen durch Spaltung mit krankheitsspezifischen Enzymen, z.B. Glutathion-S-Transferasen, Glucuronidasen, Galactosidasen, der Wirkstoff oder ein Wirkstoffderivat freigesetzt wird. Es ist auch ohne weiteres möglich, dass eine enzymatisch spaltbare Bindung aus einer Peptidsequenz und einer der vorstehend genannten Bindungen, die keine Peptidbindung ist, aufgebaut ist.

Alle genannten Bindungstypen - hydrolytisch spaltbare Bindung, säurelabile Bindung, Peptidbindung, enzymatisch spaltbare Bindung, die keine Peptidbindung enthält, und eine Bindung, die aus einer Peptidsequenz und einer nicht-Peptidbindung aufgebaut ist - gewährleisten, daß die pharmazeutisch und/oder diagno-

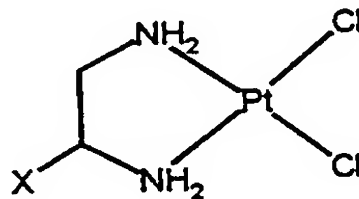
stisch wirksame Substanz oder ein entsprechend aktives Derivat am Wirkort extrazellulär und/oder intrazellulär gespalten wird und die Substanz seine pharmazeutische und/oder diagnostische Wirkung entfalten kann.

- 5 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die pharmazeutisch aktive Substanz ein Zytostatikum, ein Zytokin, ein Immunsuppressivum, ein Antirheumatikum, ein Antiphlogistikum, ein Antibiotikum, ein Analgetikum, ein Virostatikum oder ein Antimytotikum. Besonders geeignete Zytostatika der Konjugate der vorliegenden Erfindung sind die N-Nitrosoharnstoffe wie Nimustin, die Anthra-
- 10 zyklone Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Mitoxantron und Ametantron sowie verwandte Derivate, die Alkylantien Chlorambucil, Bendamustin, Melphalan und Oxazaphosphorine sowie verwandte Derivate, die Antimetabolite, beispielsweise Purin- oder Pyrimidinantagonisten und Folsäureantagonisten wie Methotrexat, 5-Fluorouracil, 5'-Desoxy-5-fluorouridin und Thioguanin
- 15 sowie verwandte Derivate, die Taxane Paclitaxel und Docetaxel sowie verwandte Derivate, die Camptothecine Topotecan, Irinotecan, 9-Aminocamptothecin und Camptothecin sowie verwandte Derivate, die Podophyllotoxinderivate Etoposid, Teniposid und Mitopodozid sowie verwandte Derivate, die Vinca-Alkaloide Vinblastin, Vincristin, Vindesin und Vinorelbin sowie verwandte Derivate, Calicheamicine, Maytansinoide und *cis*-konfigurierte Platin(II)-Komplexverbindungen
- 20 der allgemeinen Formeln I bis XII:

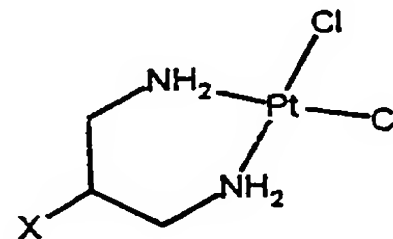
25



Formel I



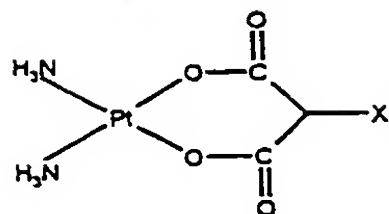
Formel II



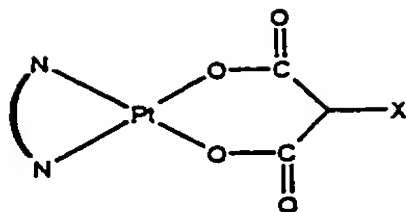
Formel III

30

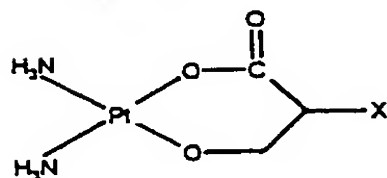
Formel IV



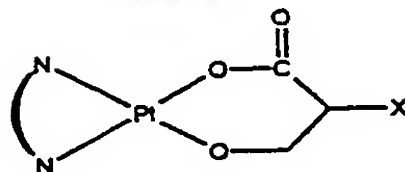
Formel V



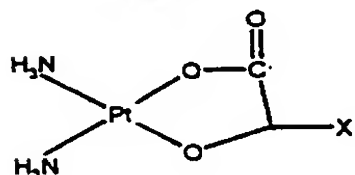
Formel VI



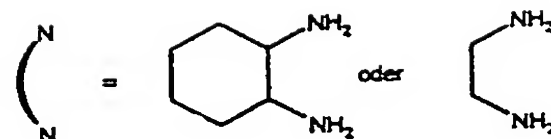
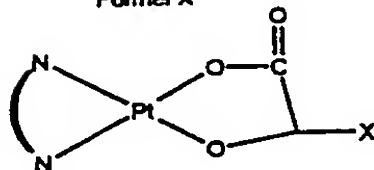
Formel VII



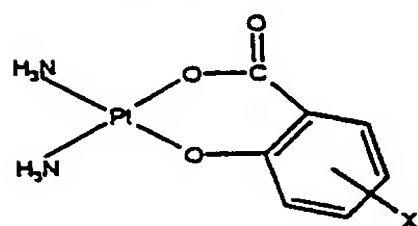
Formel IX



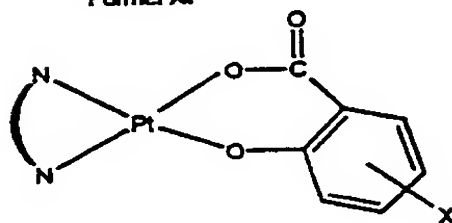
Formel X



Formel XI



Formel XII



wobei X das Spacermolekül oder die thiolbindende Gruppe ist.

Besonders geeignete Zytokine in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Interleukin 2, Interferon α -2a, Interferon α -2b, Interferon β -1a, Interferon β -1b, Interferon γ -1b und verwandte Derivate. Die verwendeten Zytokine sind i.d.R. gentechnisch hergestellte Arzneimittel.

Besonders geeignete Immunsuppressiva in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Cyclosporin A, FK 506 und verwandte Derivate.

Besonders geeignete Antirheumatika in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Methotrexat, Sulfasalazin, Chloroquin und verwandte Derivate.

Besonders geeignete Antiphlogistika und/oder Analgetika in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Salicylsäurederivate, wie etwa Acetylsalicylsäure und verwandte Derivate, Pharmaka-Derivate, die eine Essig- oder Propionsäuregruppe aufweisen, wie etwa Diclofenac bzw. Indometacin oder Ibuprofen bzw. Naproxen, und Aminophenolderivate, wie etwa Paracetamol.

Besonders geeignete Antimykotika in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Amphotericin B und verwandte Derivate.

Bevorzugte Virostatika in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Nukleosidanaloga, wie Aciclovir, Ganciclovir, Idoxuridin, Ribavirin, Vidarabin, Zidovudin, Didanosin und 2',3'-Didesoxycytidin (ddC) und verwandte Derivate sowie Amantadin.

Bevorzugte Antibiotika im erfindungsgemäßen Konjugat sind Sulfonamide, beispielsweise Sulanilamid, Sulfacarbamid und Sulfametoxydiazin und verwandte Derivate, Penicelline, beispielsweise 6-Aminopenicillansäure, Penicillin G sowie Penicillin V und verwandte Derivate, Isoxazoylpenicelline, wie Oxacillin, Cloxacillin und Flucloxacillin sowie verwandte Derivate, α -substituierte Benzylpenicilline, wie Ampicillin, Carbenicillin, Pivampicillin, Amoxicillin und verwandte Derivate, Acylaminopenicelline, beispielsweise Mezlocillin, Azlocillin, Piperacillin, Apalicillin und verwandte Derivate, Amidinopenicilline, beispielsweise Mecillinam, atypische β -Lactame, wie Imipenam und Aztreonam, Cephalosporine, beispielsweise Cefalexin, Cefradin, Cefaclor, Cefadroxil, Cefixim, Cefpodoxim, Cefazolin, Cefazedon, Cefuroxim, Cefamandol, Cefotiam, Cefoxitin, Cefotetan, Cefmetazol, Latamoxef, Cefotaxim, Ceftriaxon, Ceftizoxim, Cefmonoxim, Ceftazidim, Cefsulodin und Cefoperazon sowie verwandte Derivate, Tetracycline, wie Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Demeclocyclin, Rolitetracyclin, Doxycyclin, Minocyclin und verwandte Derivate, Chloramphenicol, wie Chlor-amphenicol und Thiamphenicol sowie verwandte Derivate, Gyrasehemmstoffe, beispielsweise Nalixidinsäure, Pipemidsäure, Norfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin und Enoxacin sowie verwandte Derivate, und Tuberkulos mitt I, wie Iso-niazid und verwandte Derivate.

Selbstverständlich kann im erfindungsgemäßen Konjugat pro Mol eine einzelne Pharmakonspezies (beispielsweise ein Pharmakon mit einem Zytostatikum als pharmazeutisch aktiver Substanz) oder unterschiedliche Pharmakonspezies (beispielsweise mehrere unterschiedliche Zytostatika oder ein Zytostatikum und ein Antiphlogistikum usw. als pharmazeutisch aktive Substanz) gebunden vorliegen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats umfaßt das Spacermolekül einen substituierten oder unsubstituierten, verzweigt- oder unverzweigt-kettigen aliphatischen Alkylrest mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen und/oder mindestens einen substituierten oder unsubstituierten Arylrest und/oder einen aliphatischen Kohlenstoffring mit 3 bis 12 Kohlenstoffatomen. Der aliphatische Alkylrest enthält vorzugsweise 1 bis 20 Kohlenstoffatome, die teilweise durch Sauerstoffatome ersetzt sein können, um beispielsweise die Wasserlöslichkeit zu erhöhen, wobei sich solche Reste vorzugsweise von einer Oligoethylenoxid- oder -propylenoxidkette ableiten. Besonders geeignete Reste, die von Oligoethylenoxid- oder -propylenoxidketten abgeleitet sind, umfassen beispielsweise Di-ethylenglycol-, Triethylenglycol- und Dipropylenglycolketten. Ein bevorzugter Arylrest ist ein unsubstituierter oder substituierter Phenylrest, bei welchem ebenfalls ein oder mehrere Kohlenstoffatome durch Heteroatome ersetzt sein können. Bevorzugte Substituenten des aliphatischen Alkylrests bzw. des Arylrests sind hydrophile Gruppen, wie Sulfonsäure-, Aminoalkyl- und Hydroxygruppen.

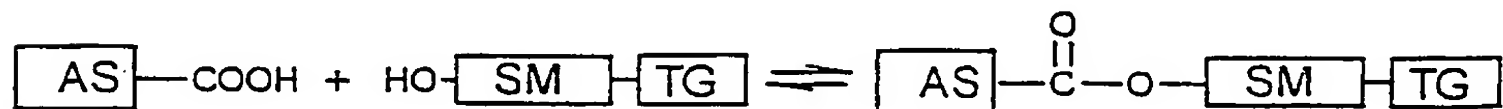
Bevorzugte diagnostisch wirksame Substanzen des erfindungsgemäßen Konjugats enthalten beispielsweise ein oder mehrere Radionuklide, ein oder mehrere Radionuklide umfassende, vorzugsweise solche Radionuklide komplexierende Liganden, ein oder mehrere Positronenstrahler, ein oder mehrere NMR-Kontrastmittel, eine oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder ein oder mehrere Kontrastmittel im nahen IR-Bereich.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats umfaßt die thiolbindende Gruppe eine Maleinimidgruppe, eine Halogenaceta-

midgruppe, eine Halogenacetatgruppe, eine Pyridyldithio-Gruppe, eine Vinyl-carbonylgruppe, eine Aziridingruppe, eine Disulfidgruppe oder eine Acetylen-
gruppe, die gegebenenfalls substituiert sind.

- 5 Das Pharmakon oder Pharmakaderivat der erfindungsgemäßen Konjugate kann je nach der vorliegenden funktionellen Gruppe gemäß einer der folgenden all-gemeinen Beschreibungen hergestellt werden.

10 Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine HOOC-Gruppe besitzen, können beispielsweise folgendermaßen derivatisiert werden:



15

Die Veresterung erfolgt dabei durch im Stand der Technik bekannte Verfahren.

- 20 Es ist weiterhin möglich, die HOOC-Gruppe in eine Hydrazidgruppe zu überfüh-ren, z.B. durch Umsetzen mit tert.-Alkylcarbazaten und anschließende Spaltung mit Säuren (beschrieben in DE-A-196 36 889), und das eine Hydrazidgruppe aufweisende Pharmakon mit einer eine Carbonylkomponente enthaltenden Gruppe, bestehend aus der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül,
25 umzusetzen, wie u.a. in DE-A-196 36 889 beschrieben ist:



30

R = H, Alkyl, Phenyl, substituiertes Phenyl

Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine

H₂N-Gruppe besitzen, können beispielsweise folgendermaßen derivatisiert werden:



R = H, Alkyl, Phenyl, substituiertes Phenyl

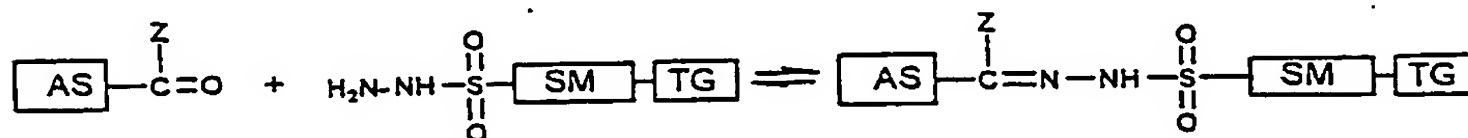
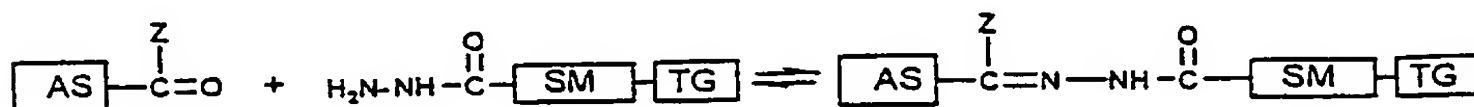
Die Reaktion zu den Iminderivaten erfolgt dabei durch im Stand der Technik bekannte Verfahren.

Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine HO-Gruppe besitzen, können beispielsweise folgendermaßen derivatisiert werden:



Die Veresterung erfolgt dabei durch im Stand der Technik bekannte Verfahren.

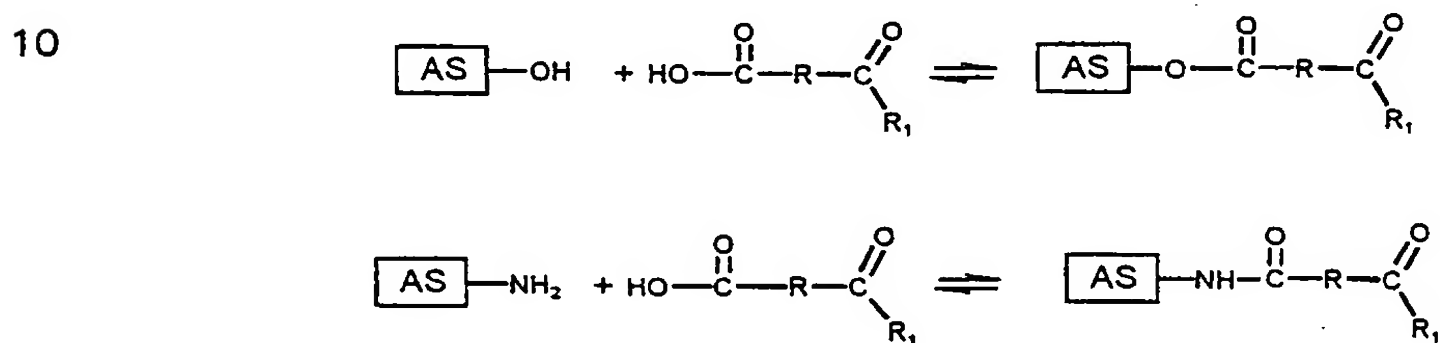
Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine Carbonylkomponente besitzen, können beispielsweise folgendermaßen derivatisiert werden:



Z = chemische Gruppe der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz

Die Umsetzung zu den Carboxyhydrazon-, Sulfonylhydrazon-, Hydrazon- bzw. Iminderivaten erfolgt dabei durch im Stand der Technik bekannte Verfahren.

Es ist weiterhin möglich, eine HO-Gruppe oder eine NH₂-Gruppe einer pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz in eine Carbonylkomponente zu überführen, beispielsweise durch eine Veresterung bzw. Amidbildung mit einer Carbonsäure-tragenden Carbonylkomponente gemäß den folgenden allgemeinen Reaktionsschemata,



15 wobei R eine aliphatische Kohlenstoffkette und/oder ein aliphatischer Kohlenstoffring und/oder ein Aromat und R₁ = H, Alkyl, eine unsubstituierte Phenylgruppe oder ein substituierter Phenylrest ist. R besteht vorzugsweise aus 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, die gegebenenfalls substituiert, beispielsweise durch hydrophile Gruppen wie Sulfonsäure-, Aminoalkyl- oder Hydroxygruppen, sein können. Der Aromat ist vorzugsweise ein Benzolring, der gegebenenfalls substituiert sein kann. Bevorzugte Substituenten sind beispielsweise die vorstehend genannten hydrophilen Gruppen.

25 Die Carbonylkomponente kann des weiteren durch andere chemische Reaktionen eingeführt werden, beispielsweise durch eine elektrophile Substitution an der HO- oder NH₂-Gruppe des Wirkstoffs mit einer geeigneten Carbonylkomponente.

30 Die derart derivatisierten Pharmaka, die nunmehr eine Carbonylkomponente aufweisen, werden analog zu den vorstehend beschriebenen Verfahren mit den Trägermolekül-bindenden Spacermolekülen, die eine Amino-, Hydrazid- oder Hydrazingruppe aufweisen, zu den entsprechenden Carboxylhydrazon-, Sulfonylhydrazon-, Hydrazon- bzw. Iminderivaten umgesetzt. Die Spaltung dieser säure-

labilen Bindungen führt demnach zu einer Freisetzung der derivatisierten pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz, die eine Carbonylkomponente aufweist.

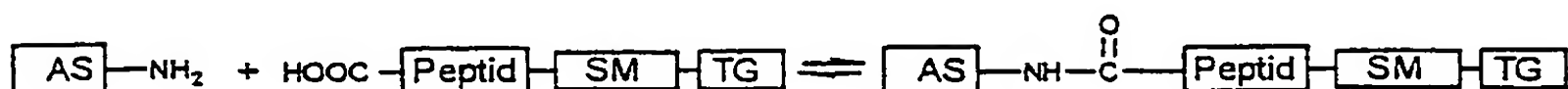
5 Die Gruppen, die aus der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül bestehen, können beispielsweise gemäß Verfahren, die u.a. in DE-A-196 36 889, U. Beyer et al., 1997 (*Chemical Monthly*, 128, 91, 1997), R.S. Greenfield et al., 1990 (*Cancer Res.*, 50, 6600, 1990), T. Kaneko et al., 1991 (*Bioconjugate Chem.*, 2, 133, 1991), Bioconjugate Techniques (G.T. Hermanson, Academic
10 Press, 1996) oder im US-Patent 4,251,445 beschrieben sind, hergestellt werden.

Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine Peptidbindung enthalten, können beispielsweise dadurch hergestellt werden, daß
15 ein Peptid, das aus 2 bis etwa 30 Aminosäuren besteht, mit einer thiolbindenden Verbindung umgesetzt wird, so daß eine thiolbindende Gruppe direkt oder über ein Spacermolekül am N-terminalen Ende des Peptids eingeführt wird. Die Synthese von solchen Trägermolekül-bindenden Peptidderivaten erfolgt vorzugsweise durch eine einem Fachmann bekannte Festphasensynthese, wobei im
20 letzten Schritt des Peptidaufbaus ein Carbonsäure-tragendes, Trägermolekül-bindendes Spacermolekül, z.B. eine Maleinimidcarbonsäure, durch Peptidkoppelung an das N-terminale Ende der Peptids gebunden und das Trägermolekül-bindende Peptid anschließend von der Festphase abgespalten wird.

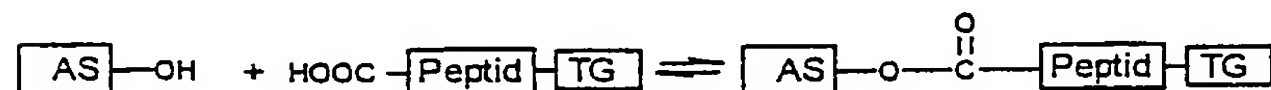
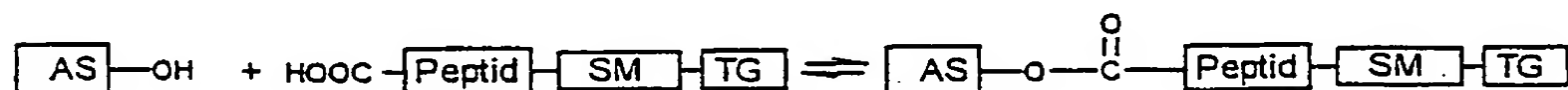
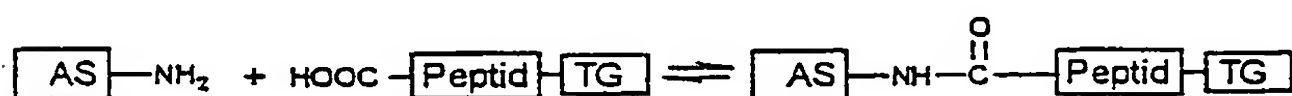
25 Die so erhaltenen Peptidderivate können mit Pharmaka oder Pharmakaderivaten, die eine H₂N- oder HO-Gruppe besitzen, in der Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie zum Beispiel N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluol-sulfonat (CMC) oder (Benzotriazol-1-yloxy)-trispyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (pyBOP) oder Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat,
30 und gegebenenfalls unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid oder eines wasserlöslichen N-Hydroxysuccinimids, wie etwa des Natriumsalzes der N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure, oder 1-Hydroxybenzotriazol und/oder in Gegenwart einer

Base, beispielsweise N-Methylmorpholin oder Triethylamin, zu den entsprechenden thiolbindenden Pharmaka-Peptidderivaten umgesetzt werden:

5



10



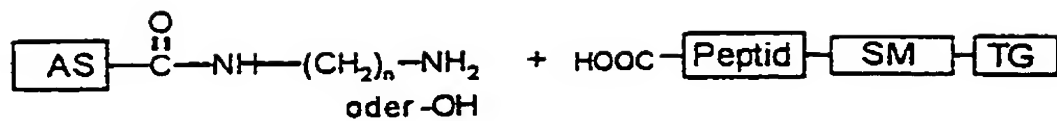
15

Es ist weiterhin möglich, über die HOOC-Gruppe der Pharmaka der erfindungsgemäßen Konjugate eine H₂N- oder HO-Gruppe einzuführen, beispielsweise durch

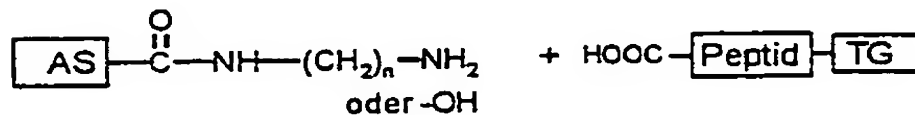
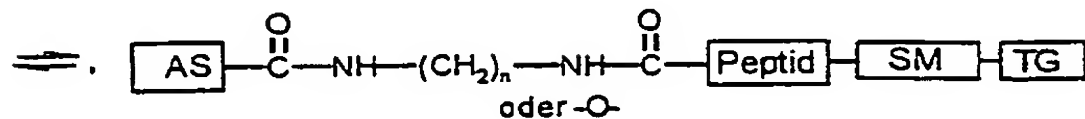
Derivatisierung über die α -Aminogruppe der Aminosäuren Lysin, Serin oder Threonin oder mit einer Diaminoverbindung der allgemeinen Formel H₂N-(CH₂)_n-NH₂ oder einem Alkoholamin der allgemeinen Formel H₂N-(CH₂)_n-OH mit n = 1 bis 12, und diese Derivate im Anschluß mit den oben genannten Peptidderivaten zu den entsprechenden thiolbindenden Pharmaka-Peptidderivaten umzusetzen:

20

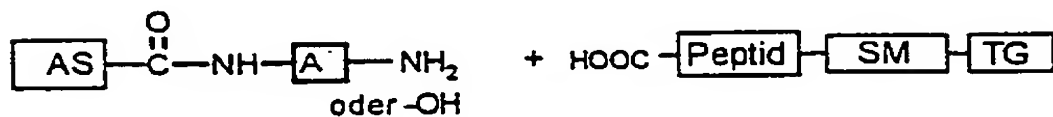
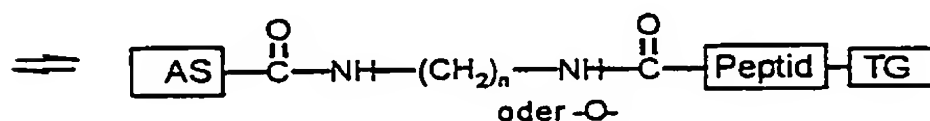
25



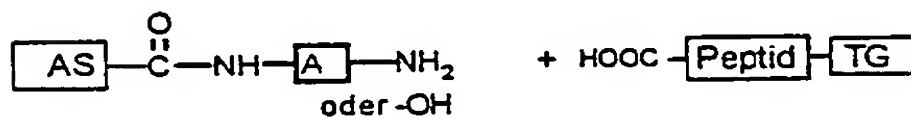
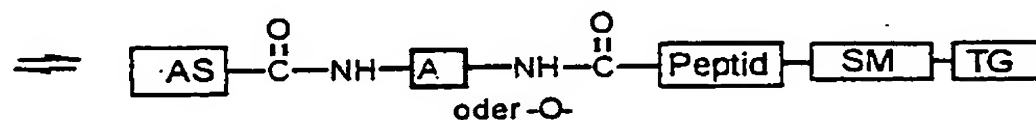
5



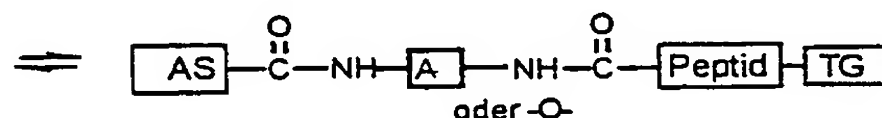
10



15



20



A = Lysin, Serin oder Threonin

25

Die Substratspezifität von Targetenzymen, wie etwa von MMP 2, MMP 3, MMP 9, Cathepsin B und H, ist bekannt (Netzel-Arnett et al. (1993), *Biochemistry* 32, 6427-6432, Shuja, S., Sheahan, K., Murnane, M.J. (1991), *Int.J.Cancer* 49, 341-346, Lah, T.T., Kos, J. (1998), *Biol. Chem.* 379, 125-130).

30

Beispielsweise sind Octapeptide ($P_4 - P'_4$) für MMP 2 und MMP 9 (siehe Tabelle 1) identifiziert worden, welche die Spaltsequenz der Kollagenkette simulieren, und besonders effizient von MMP 2 und 9 gespalten werden (Aminosäuren sind

im folgenden entsprechend dem internationalen Dreibuchstabencode abgekürzt):

Tabelle 1:

5	Peptid							
	P_4	P_3	P_2	P_1	P'_1	P'_2	P'_3	P'_4

	Gly-Pro-Leu-Gly—Ile-Ala-Gly-Gln							
	Gly-Pro-Gln-Gly—Ile-Trp-Gly-Gln							
10	(Netzel-Arnett et al., <i>Biochemistry</i> 32, 1993, 6427-6432)							

Die Peptide werden ausschließlich an der P_1 - P'_1 -Bindung enzymatisch gespalten.

15 Desweiteren sind bei Cathepsin B substratspezifische Peptide bekannt mit der Sequenz -Gly-Phe-Leu-Gly-, -Gly-Phe-Ala-Leu-, -Ala-Leu-Ala-Leu-, -Arg-Arg- oder -Phe-Lys- (Werle, B., Ebert, E., Klein, W., Spiess, E. (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 157-164; Ulrich, B., Spiess, E., Schwartz-Albiez, R., Ebert, W. (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 404-414).

Die Peptidsequenz, welche die für das Targetenzym relevante Peptidsollbruchstelle enthält, kann auch so aufgebaut sein, daß die Peptidsollbruchstelle mehrfach wiederholt wird, wie beispielsweise durch:

25 -Gly-Pro-Leu-Gly—Ile-Ala-Gly-Gln-Gly-Pro-Leu-Gly—Ile-Ala-Gly-Gln

oder

30 -Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-

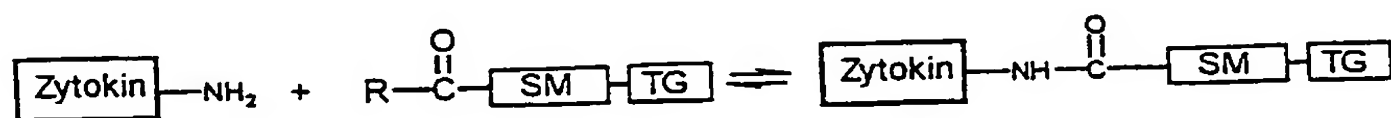
oder es kann eine repetitive Peptidsequenz integriert werden, die den Abstand zwischen der thiolbindenden Gruppe und der relevanten Peptidsollbruchstelle vergrößert, wie beispielsweise durch:

-(Gly)_n-Phe-Lys-Phe-Lys-

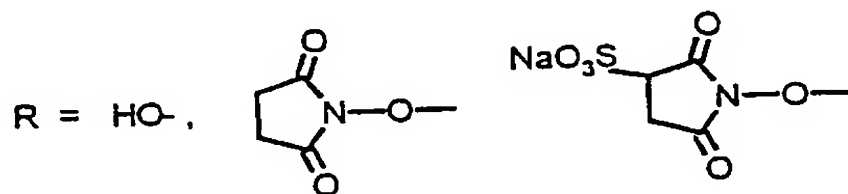
mit vorzugsweise $n = 2$ bis 20, mehr bevorzugt $n \leq 12$.

- 5 Ein wichtiges Merkmal dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats ist die Tatsache, daß die für das jeweilige Targetenzym relevante Peptidsolbruchstelle mindestens einmal in einem Oligopeptid, bestehend aus etwa 1 bis 30 Aminosäuren, vorkommt. Die oben aufgeführten Oligopeptide sind repräsentative Beispiele für die enzymatisch spaltbare Bindung in den erfindungsgemäßen Konjugaten und schränken die Erfindung nicht ein.

Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die ein Zytokin enthalten, können beispielsweise dadurch hergestellt werden, daß das Zytokin mit einem eine thiolbindende Gruppe enthaltenen Spacermolekül, das eine Carbonsäure oder eine aktivierte Carbonsäure aufweist, umgesetzt wird:



20



25

30 Weist das Spacermolekül eine N-Hydroxysuccinimidester-Gruppe (N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure, Natriumsalz) auf, wird es direkt mit dem Zytokin umgesetzt. Die Umsetzung des Zytokins mit einem eine thiolbindende Gruppe enthaltenen Spacermolekül, das eine Carbonsäure aufweist, erfolgt in der Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie zum Beispiel N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat (CMC), und gegebenenfalls unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid oder dem Natriumsalz der N-Hydroxysuccinimid-3-sulfon-

säure, zu den entsprechenden thiolbindenden Zytokinderivaten. Die Aufreinigung der so derivatisierten Zytokine erfolgt in d r Regel mit Hilfe der Ausschlußchromatographie. Die oben beschriebenen Umsetzungen sind einem Fachmann geläufig (siehe z.B. Bioconjugate Techniques, G.T. Hermanson, Academic Press, 1996).

Die oben beschriebenen Pharmaka oder Pharmakaderivate werden an einen Träger, enthaltend eine Polypeptidsequenz mit einem oder mehreren Cystein-Resten wie beispielsweise natives oder rekombinantes Albumin, gekoppelt, so daß im erfindungsgemäßen Konjugat pro Mol Cystein-Rest mehr als 0,7 Mol, vorzugsweise mindestens 0,9 Mol, Pharmakon über die thiolbindende Gruppe an den Träger gebunden sind. Enthält die Polypeptidsequenz des Trägers n (beispielsweise 3) Cystein-Reste, so bedeutet dies, daß 1 Mol dieses Trägers n (beispielsweise 3) Mol Cystein-Reste enthält und daher pro Mol des entsprechenden Konjugats maximal n (beispielsweise 3) Mol Pharmakon an den Träger gebunden vorliegen können. Im Idealfall sind im erfindungsgemäßen Konjugat daher 100% der im Träger vorhandenen Cystein-Reste über die thiolbindende Gruppe mit einem Pharmakon verbunden.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung eines wie oben definierten Konjugats, umfassend

- (i) Behandlung des Trägers mit einem Reduktionsmittel, so daß mehr als 0,7 Mol, vorzugsweise mindestens 0,9 Mol, Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Rest im Träger vorliegen und
- (ii) Kopplung des Pharmakons über die thiolbindende Gruppe an die Cystein-SH-Gruppen im Träger.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das zur Behandlung des Trägers verwendete Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT), Dithioerythritol (DTE) oder Mercaptoethanol. Das besonders bevorzugte Reduktionsmittel ist DTT.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf d r Erkenntnis, daß die im Stand

der Technik bekannten Träger in einem inhomogenen Oxidationsstatus vorliegen. Beispielsweise lassen sich im Fall des im Handel erhältlichen nativen Albumins in der Regel mit dem photometrischen Essay nach Ellmann $\approx 0,2$ bis $0,7$ Mol HS-Gruppen pro Mol Cystein-Reste im Albumin nachweisen, d.h. das Cystein-34 ist häufig durch schwefelhaltige Verbindungen, wie etwa Cystein oder Glutathion, über eine Disulfidbindung oxidiert. Das bedeutet, daß die im Albumin vorhandenen Cystein-SH-Gruppen zumindest häufig nicht frei vorliegen, was bisher dazu führte, daß die Ausbeute an hergestellten Konjugaten zu gering und/oder stark schwankend von Albumin- zu Albumincharge war.

Erfindungsgemäß wurde festgestellt, daß im Handel erhältliche Träger mit einem Reduktionsmittel behandelt werden können, wobei die durch Disulfidbindungen oxidierten Cysteingruppen reduziert werden, so daß mehr als $0,7$ Mol Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Reste im Träger vorliegen. Die Reaktion wird vorzugsweise so gesteuert, daß mindestens $0,9$ Mol Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Rest im Träger verfügbar werden.

Die Umsetzung des Reduktionsmittels mit einem im Handel erhältlichen Träger, z.B. Albumin, erfolgt beispielsweise in einem Salzpuffer, z.B. in $0,01$ M Natriumborat, $0,15$ M NaCl, $0,001$ M EDTA oder $0,15$ M NaCl, $0,004$ M Phosphat in einem pH-Bereich von $5,0$ bis $8,0$, vorzugsweise von $6,0$ bis $7,0$. Das Reduktionsmittel kann im Überschuß eingesetzt werden, vorzugsweise ist das Verhältnis von Reduktionsmittel zu Träger zwischen $0,5:1$ und $10:1$. Die Reaktionszeit beträgt zwischen 1 h und 96 h, vorzugsweise zwischen 6 h und 24 h.

Der mit dem Reduktionsmittel behandelte Träger wird z.B. durch Gelfiltration (beispielsweise Sephadex® G10 oder G25, Laufmittel: $0,004$ M Phosphat, $0,15$ M NaCl - pH $7,4$) oder durch Ultrafiltration isoliert.

Die Konzentration an Träger nach erfolgter Gelfiltration wird durch den Extinktionskoeffizienten bei 280 nm, die Anzahl der eingeführten HS-Gruppen wird mit Ellmann's Reagenz bei 412 nm bestimmt. Die so isolierte Trägerlösung kann direkt für die Synthese der Konjugate eingesetzt werden. Es ist auch möglich,

die Trägerlösung mit einem handelsüblichen Konzentrator aufzukonzentrieren oder zu lyophilisieren. Die isolierte Trägerlösung oder das Lyophilisat kann im Temperaturbereich von -78 bis $+30$ °C gelagert werden.

- 5 Die Kopplung der oben beschriebenen Pharmakaderivate an den Träger erfolgt beispielsweise bei Raumtemperatur. Dabei wird zu dem Träger, der sich in einem Salzpuffer (beispielsweise $0,15$ M NaCl - pH $6,0$ bis $8,0$), der eventuell vorher entgast wurde, befindet, ein etwa $1,1$ - bis 10 -facher Überschuß des wie oben beschrieben hergestellten Pharmakons (bezogen auf die Anzahl der vorhandenen
- 10 HS-Gruppen im Träger), gelöst in einer minimalen Menge Lösungsmittel, beispielsweise DMF, Dimethylsulfoxid, Wasser, Salzpuffer, Ethanol, Methanol, Propylenglykol, Glycerin, Acetonitril oder THF (etwa 1 bis 10% des Volumens der Trägerprobe), gegeben. Es ist auch möglich, das Pharmakon als Festsubstanz zur Trägerlösung zu geben. Desweiteren kann es vorteilhaft sein, vor der Kopp-
- 15 lung einen Hilfsstoff, wie etwa eine Fettsäure oder ein Tryptophonatderivat, zur Trägerlösung zu geben. Nach einer Reaktionszeit zwischen 5 min und 48 h wird die Lösung, falls erforderlich, zentrifugiert, und das gebildete Träger-Pharmakon-Konjugat wird durch anschließende Gelfiltration (beispielsweise Sephadex® G10 oder G25) in einem Salzpuffer, wie etwa $0,004$ M Phosphat, $0,15$ M NaCl - pH
- 20 $6,0$ bis $8,0$, isoliert.

Die Reinheit des entstandenen Konjugats kann beispielsweise durch HPLC, z.B. durch Außschlußchromatographie, überprüft werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen Konjugaten weisen die gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des

25 erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Konjugate eine Reinheit von mehr als 95% auf.

Die Lösung des so erhaltenen Konjugats kann mit einem handelsüblichen Konzentrator aufkonzentriert werden. Die Konjugate können in gelöster Form bei $+1$

30 bis $+30$ °C oder in gefrorener Form bei $T = 0$ °C bis -78 °C gelagert werden. Desweiteren ist es möglich, die Lösung der Konjugate zu lyophilisieren und das Lyophilisat bei $+30$ ° bis -78 °C zu lagern.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Arzneimittel, enthaltend ein wie oben definiertes Konjugat, und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder Hilfsstoff und/oder ein Verdünnungsmittel. Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann bevorzugt zur Behandlung von Krebskrankheiten, Autoimmunerkrankungen, akuten oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Viren oder Mikroorganismen wie beispielsweise Bakterien und/oder Pilze verursacht sind, verwendet werden.

Noch eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft einen diagnostischen Kit, enthaltend ein wie oben definiertes Konjugat. Der erfindungsgemäße diagnostische Kit kann bevorzugt zum Nachweis der wie vorstehend definierten Erkrankungen und/oder zum Nachweis von Molekülen des Trägers und/oder deren Verteilung im Körper verwendet werden.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1 (A) ist ein HPLC-Chromatogramm eines erfindungsgemäßen Konjugats (A-DOXO-HYD-C). Es ist die Absorption bei 495 nm gegen die Retentionszeit in min aufgetragen. (B) ist das entsprechende HPLC-Chromatogramm von im Handel erhältlichem nativem Albumin (Immuno GmbH).

Fig. 2 zeigt HPLC-Chromatogramme (Ausschlußchromatographie-Säule Biosil 250 SEC der Fa. Biorad) eines erfindungsgemäßen Konjugats (HSA-Cys³⁴-2), welches durch die Matrixmetalloprotease MMP 9 spaltbar ist. Es ist jeweils die Absorption bei 495 nm gegen die Retentionszeit in min aufgetragen. (A) Chromatogramm des Konjugats HSA-Cys³⁴-2 vor der Inkubation mit MMP 9 (t = 0). (B) Chromatogramm des Konjugats HSA-Cys³⁴-2 nach der Inkubation mit MMP 9 für 30 min (t = 30 min).

Fig. 3 zeigt die graphische Darstellung der Gewichte und Volumen von Nieren und Nierentumoren (A) sowie der Gewichte von Lungen und die Anzahl der Lungenmetastasen (B) von Mäusen, bei denen ein Nierenkarzinom erzeugt wurde, und die den angegebenen Behandlungen ausgesetzt wur-

den (Kontrolle: keine Behandlung; Albumin-Kontrolle: natives Albumin; Doxo: Doxorubicin; A-DOXO-HYD-C: erfindungsgemäßes Konjugat). Zum Vergleich sind auch die Daten für Mäuse, denen keine Tumorzellen injiziert wurden, abgebildet (kein Tumor).

5

Das folgende Beispiel erläutert die vorliegende Erfindung näher, ohne sie einzuschränken.

BEISPIEL

10

Umsetzung von humanem Serumalbumin (HSA) mit Dithiothreitol (DTT)

15

20

25

30

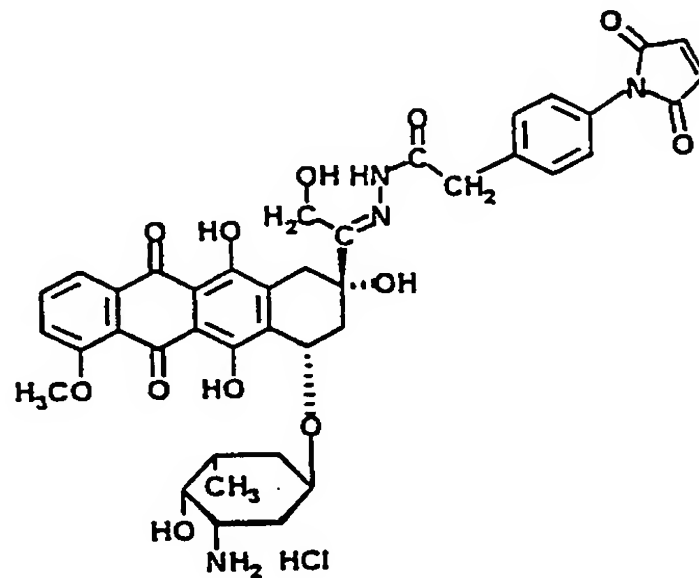
Das Verfahren für die Behandlung von HSA mit einem Reduktionsmittel wird durch folgendes Beispiel genauer dargestellt: 2,0 g humanes Serumalbumin (10 ml einer 20%igen HSA-Lösung, Pharma Dessau) wird mit 10 ml Puffer A (0,004 M Natriumphosphat, 0,15 M NaCl - pH 7,0) verdünnt und mit 100 μ l einer frisch hergestellten $0,036 \times 10^{-2}$ M DTT-Lösung (5,55 mg DTT gelöst in 100 μ l Puffer A) versetzt und das Reaktionsgefäß sanft unter Luftausschluss während 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird die Albuminlösung durch Gelfiltration (Säule 5,0 cm x 25,0 cm, Sephadex® G.25; Laufpuffer 0,004 M Natriumphosphat, 0,15 M NaCl - pH 7,4) aufgereinigt. Die Proteinkonzentration nach erfolgter Gelfiltration wurde photometrisch bei 280 nm ($\epsilon(\text{HSA})_{280} = 35\,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ - $c[\text{HSA}] \approx 3,1 \times 10^{-4} \text{ M}$) und die Anzahl der eingeführten HS-Gruppen mit Ellmanns Reagenz bei 412 nm ($\epsilon_{412} = 13\,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ - $c[\text{HS-Gruppen}] \approx 3,07 \times 10^{-4} \text{ M}$) bestimmt. Daher liegen im so behandelten HSA 0,99 Mol freie Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Rest vor. Das behandelte HSA wurde auf etwa $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ eingengt (Centriprep-10®) und direkt für die unten aufgeführte Kopplungsreaktion mit einem thiolbindenden Pharmakon der vorliegenden Erfindung verwendet.

Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats A-DOXO-HYD-C

Das HSA-Doxorubicin-Konjugat (A-DOXO-HYD-C), bestehend aus gemäß obigem

Beispiel mit DTT behandeltem HSA und einem Maleinimidophenyllessigsäurehydrazon-Derivat von Doxorubicin (DOXO-HYD), wurde weiterhin folgendermassen hergestellt.

5 Struktur von DOXO-HYD:



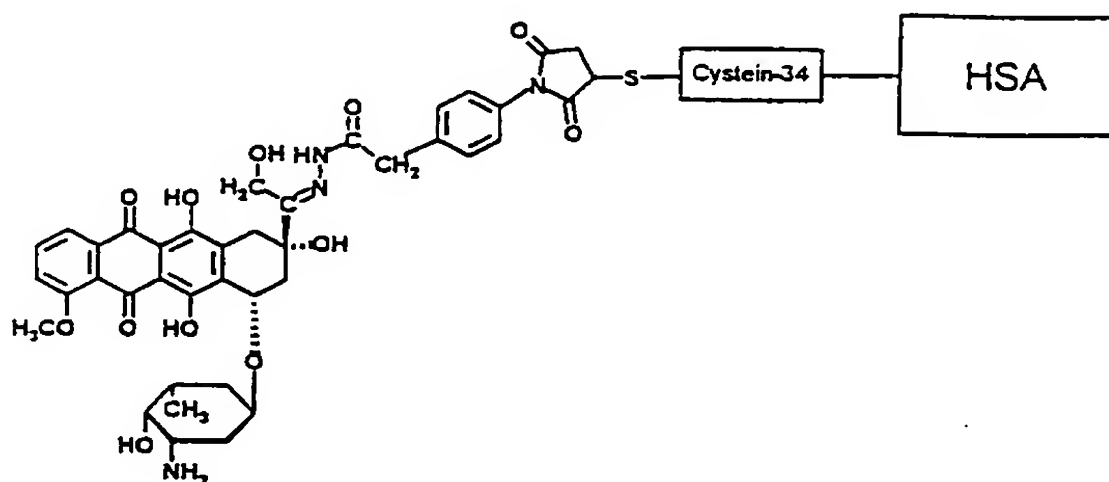
12 ml der mit DTT behandelten HSA-Probe (Sulfhydrylgehalt von 0,99 Mol pro Mol HSA) wurden mit 0,6 ml einer Lösung von DOXO-HYD (Mr 807,8) in DMF (12,5 mg gelöst in 0,6 ml DMF) versetzt und die Reaktionslösung während 18 h sanft geschüttelt. Das entstandene HSA-Doxorubicin-Konjugat wurde über eine Sephadex® G-25F Säule (Säule 5,0 cm x 25 cm) isoliert (Retentionsvolumen: 85 - 135 ml). Die Menge an gebundenem Doxorubicin wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von Doxorubicin bei 495 nm ($\epsilon_{495} = 10\,650\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ bei pH 7,4) bestimmt. Danach sind in diesem Beispiel pro Mol Cystein-Rest im HSA 0,97 Mol Doxorubicin an das HSA gebunden.

Methoden- FPLC für die Herstellung der Konjugate: P-500 pump, LCC 501 Controller (Pharmacia) und LKB 2151 UV-Monitor. Die Proteinkonzentration des Konjugats wurde photometrisch sowie mit dem BCA-Protein-Essay von Pierce (USA) bestimmt.

Die Reinheit des Konjugats A-DOXO-HYD-C wurde durch HPLC mit Hilfe einer analytischen Säule (Bio-Sil SEC 250, (300 mm x 7.8 mm) von Bio-RAD (mobile Phase: i.d.R. 0.15 M NaCl, 0.01 M NaH₂PO₄, 5% CH₃CN - pH 7.0) bei $\lambda =$

495 nm geprüft. Die HPLC-Chromatogramme für A-DOXO-HYD-C und von im Handel erhältlichem nativem Albumin (Immuno GmbH) sind in der Fig. 1A (A-DOXO-HYD-C) und der Fig. 1B (natives Albumin) abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, daß A-DOXO-HYD-C eine dem im Handel erhältlichen nativen Albumin vergleichbare, hervorragende Reinheit aufweist.

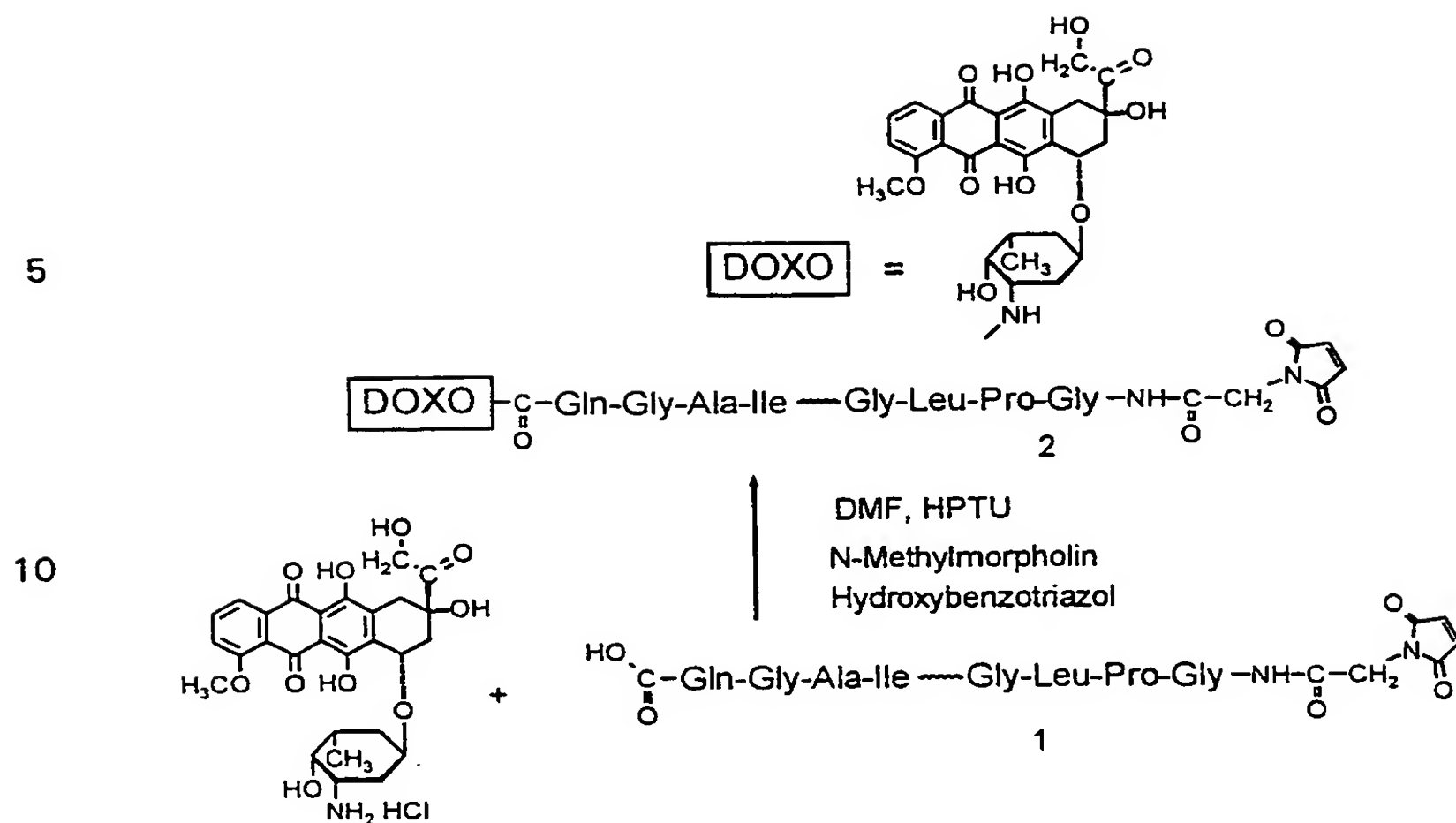
Struktur von A-DOXO-HYD-C:



(HSA = humanes Serumalbumin)

Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugats, bestehend aus mit DTT behandeltem HSA und einem durch MMP 9 spaltbaren Doxorubicin-Maleinimid-Peptid-Derivat

Das Doxorubicin-Maleinimid-Peptid-Derivat (2) wurde gemäß folgender Reaktionsgleichung hergestellt.

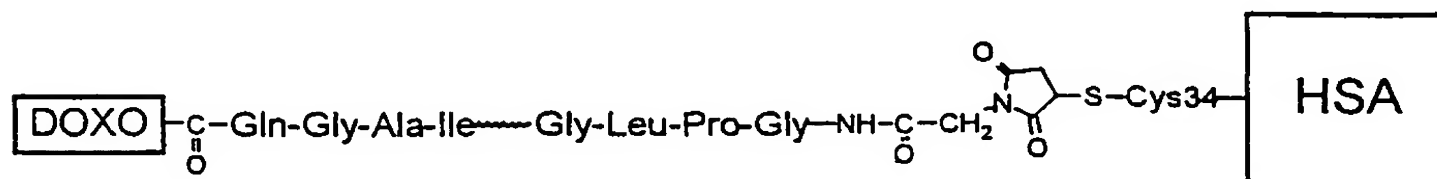


Dabei wurde das mit Maleinimidoglycin derivatisierte Octapeptid Gln-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Pro-Gly 1 (Mr 848, hergestellt durch Festphasensynthese durch Bachem AG, Schweiz) mit Doxorubicin gemäß dem folgenden Verfahren umgesetzt:

Zu einer leicht trüben Lösung von 17,1 mg Doxorubicin in 3 ml DMF werden 25 mg 1 (als Trifluoracetatsalz), gelöst in 500 μ l DMF, 33,5 mg O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HPTU), gelöst in 200 μ l DMF, 11,9 mg Hydroxybenzotriazolhydrat, gelöst in 100 μ l DMF, und 16,2 μ l N-Methylmorpholin zugegeben und der Ansatz anschließend 18 h lang bei RT in der Dunkelheit gerührt. DMF wurde unter Hochvakuum entfernt und der Feststoff in 20 ml Methanol aufgenommen, filtriert und im Vakuum auf 1 ml eingengt. Nach Aufreinigung über Kieselgel (Essigester/Methanol 2/1) wurden 5 mg 2 erhalten.

3,0 ml einer mit DTT behandelten HSA-Probe (Sulphydrylgehalt von 0,95 pro HSA-Molekül, Gehalt an HS-Gruppen $\sim 1000 \mu$ M) wurden mit einer Lösung von 2 (Mr 1374) in DMF (5,1 mg, gelöst in 250 μ l DMF) versetzt und die Reaktionslösung während 30 min sanft geschüttelt. Das entstandene Albumin-Doxorubicin-Konjugat wurde über ein Sephacryl® HR100-Säule (2,0 cm x 20

cm) isoliert. Auf diese Weise wurde das Albuminkonjugat (im folgenden mit HSA-Cys³⁴-2 bezeichnet) der folgenden Struktur isoliert (Beladungsfaktor ~ 0,9):



HSA = humanes Serumalbumin

10 Die Peptidsequenz Gln-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Pro-Gly wird von der Matrixmetalloprotease MMP 9 erkannt und zwischen Isoleucin und Glycin gespalten. Dies wurde durch folgenden Versuch gezeigt: 200 μ l einer 100 μ M Lösung von HSA-Cys³⁴-2 wurde mit Trypsin/Aprotinin-aktivierter MMP 9 (2 mU, erhalten von Calbiochem, Deutschland) 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Freisetzung von DOXO-Gln-Gly-Ala-Ile aufgrund der Spaltung mit MMP 9 wurde durch HPLC-Ausschlußchromatographie (Biosil 250 SEC Säule der Fa. Biorad, Detektion bei λ = 495 nm) vor der Inkubation (t = 0, vgl. Fig. 2A) und nach einer Inkubationszeit mit aktivierter MMP 9 von 30 Minuten (t = 30, vgl. Fig. 2B) bestätigt.

Biologische Untersuchungen

25 Als Beispiel für die *in vivo* Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Konjugate werden die biologischen Daten der HSA-Doxorubicin-Konjugats A-DOXO-HXD-C aufgeführt.

30 Im sogenannten RENCA (renal cell carcinoma)-Modell wurden Doxorubicin und das erfindungsgemäße Konjugat A-DOXO-HXD-C hinsichtlich der antitumoralen Wirksamkeit bei annähernd äquitoxischer Dosis miteinander verglichen (intravenöse Therapie 10 Tage nach Injektion von etwa 1 Million Nierenkarzinomzellen in die linke Niere).

Tiere: Balb/c- Mäuse, weiblich; **Tumor:** RENCA, renal cell carcinoma

Therapie: Tag(d) 10, 14, 18, 21 intravenös (i.v.), Ende des Versuchs: d 25

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

5

Tabelle 2

	Anzahl der Mäuse	Substanz	Dosis (mg/Kg/inj.)	Mortalität (d)	Durchschnittliche Körpergewichts- abnahme (%) d 1 bis 25
10	10	Kontrolle		2	- 14
	10	Albumin-Kontrolle	4x1,4 g	1	- 16
	10	Doxorubicin (Doxo)	4x6 mg/kg	1	- 21
	10	A-DOXO-HYD-C	4x12 mg/kg	0	- 18

15 Die Dosis bezieht sich auf die vorhandene Menge Doxorubicin. Die Dosierungen von Doxorubicin und A-DOXO-HYD-C sind annähernd äquitoxisch (siehe Körpergewichtsabnahme in der Tabelle 2).

20

Die Ergebnisse dieses Versuches sind desweiteren in der Fig. 3 hinsichtlich der Gewichte und Volumina der Nieren und Nierentumoren (Fig. 3A) sowie der Gewichte der Lungen und der Anzahl der Lungenmetastasen (Fig. 3B) graphisch dargestellt. A-DOXO-HYD-C zeigt eine sehr gute antitumorale Wirksamkeit und erzielt eine komplette Remission in allen Tieren. Makroskopisch sichtbare Lungenmetastasen konnten nur in einem Tier beobachtet werden (Fig. 3B). Bei der mit Doxorubicin behandelten Gruppe wurden deutlich sichtbare Nierentumoren in allen Tieren beobachtet (Fig. 3A), d.h. bei der optimalen Dosis von Doxorubicin (Körpergewichtabnahme: -21 % (d 1 bis 25); 1 Tier verstorben) konnten demgegenüber keine kompletten Remissionen erzielt werden. Weiterhin betrug bei den mit freiem Doxorubicin behandelten Mäusen die Anzahl der Lungenmetastasen im Durchschnitt etwa 100 Metastasen pro Maus (Fig. 3B).

30

Ansprüche

1. Träger-Pharmakon-Konjugat, umfassend einen Träger, enthaltend eine Polypeptidsequenz mit einem oder mehreren Cystein-Resten, und ein Pharmakon, enthaltend eine pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz, ein Spacermolekül und eine thiolbindende Gruppe, wobei pro Mol Cystein-Rest mehr als 0,7 Mol Pharmakon über die thiolbindende Gruppe an den Träger gebunden sind.
2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei der Träger natives oder rekombinantes Albumin ist.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül hydrolytisch und/oder pH-abhängig und/oder enzymatisch spaltbar ist.
4. Konjugat nach Anspruch 3, wobei das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung mindestens eine Peptidbindung enthält.
5. Konjugat nach Anspruch 4, wobei die Peptidbindung innerhalb einer Peptidsequenz vorliegt, welche mindestens eine Spaltsequenz einer Protease enthält.
6. Konjugat nach einem der Ansprüche 3 bis 5, wobei das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung mindestens eine säurelabile Bindung enthält.

7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die pharmazeutisch aktive Substanz ein Zytostatikum, ein Zytokin, ein Immunsuppressivum, ein Antirheumatikum, ein Antiphlogistikum, ein Antibiotikum, ein Analgetikum, ein Virostatikum oder ein Antimyotikum ist.

5

8. Konjugat nach Anspruch 7, wobei das Zytostatikum aus der Gruppe der Anthrazykline, der N-Nitrosoharnstoffe, der Alkylantien, der Purin- oder Pyrimidinantagonisten, der Folsäureantagonisten, der Taxane, der Camptothecine, der Podophyllotoxinderivate, der Vinca-Alkaloide, der Calicheamicine, der Maytansinoide oder der *cis*-konfigurierten Platin(II)-Komplexe ausgewählt ist.

10

9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die diagnostisch wirksame Substanz ein oder mehrere Radionuklide, ein oder mehrere Radionuklide umfassende Liganden, ein oder mehrere Positronenstrahler, ein oder mehrere NMR-Kontrastmittel, eine oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder ein oder mehrere Kontrastmittel im nahen IR-Bereich enthält.

15

10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die thiolbindende Gruppe eine Maleinimidgruppe, eine Halogenacetamidgruppe, eine Halogenacetatgruppe, eine Pyridyldithio-Gruppe, eine Vinylcarbonylgruppe, eine Aziridingruppe, eine Disulfidgruppe oder eine Acetylengruppe umfaßt, die gegebenenfalls substituiert sind.

20

11. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei das Spacermolekül einen substituierten oder unsubstituierten, verzweigt- oder unverzweigt-kettigen aliphatischen Alkylrest mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen und/oder mindestens einen substituierten oder unsubstituierten Arylrest und/oder einen aliphatischen Kohlenstoffring mit 3 bis 12 Kohlenstoffatomen umfaßt.

30

12. Verfahren zur Herstellung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 11, umfassend
- (i) Behandlung des Trägers mit einem Reduktionsmittel, so daß mehr als 0,7 Mol, vorzugsweise mindestens 0,9 Mol, Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Rest im Träger vorliegen und
 - (ii) Kopplung des Pharmakons über die thiolbindende Gruppe an die Cystein-SH-Gruppen im Träger.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei das Reduktionsmittel Dithiothreitol, Dithioerythritol oder Mercaptoethanol ist.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei das hergestellte Konjugat eine Reinheit von mehr als 95% aufweist.
15. Arzneimittel, enthaltend das Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 11 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder einen Hilfsstoff und/oder ein Verdünnungsmittel.
16. Arzneimittel nach Anspruch 15 zur Behandlung von Krebskrankheiten, Autoimmunkrankheiten, akuten oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Viren und/oder Mikroorganismen verursacht werden.
17. Diagnostischer Kit, enthaltend das Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 11.
18. Kit nach Anspruch 17 zum Nachweis von Krebskrankheiten, Autoimmunkrankheiten, akuten oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Viren und/oder Mikroorganismen verursacht werden, und/oder von Molekülen des Trägers und/oder deren Verteilung im Körper.

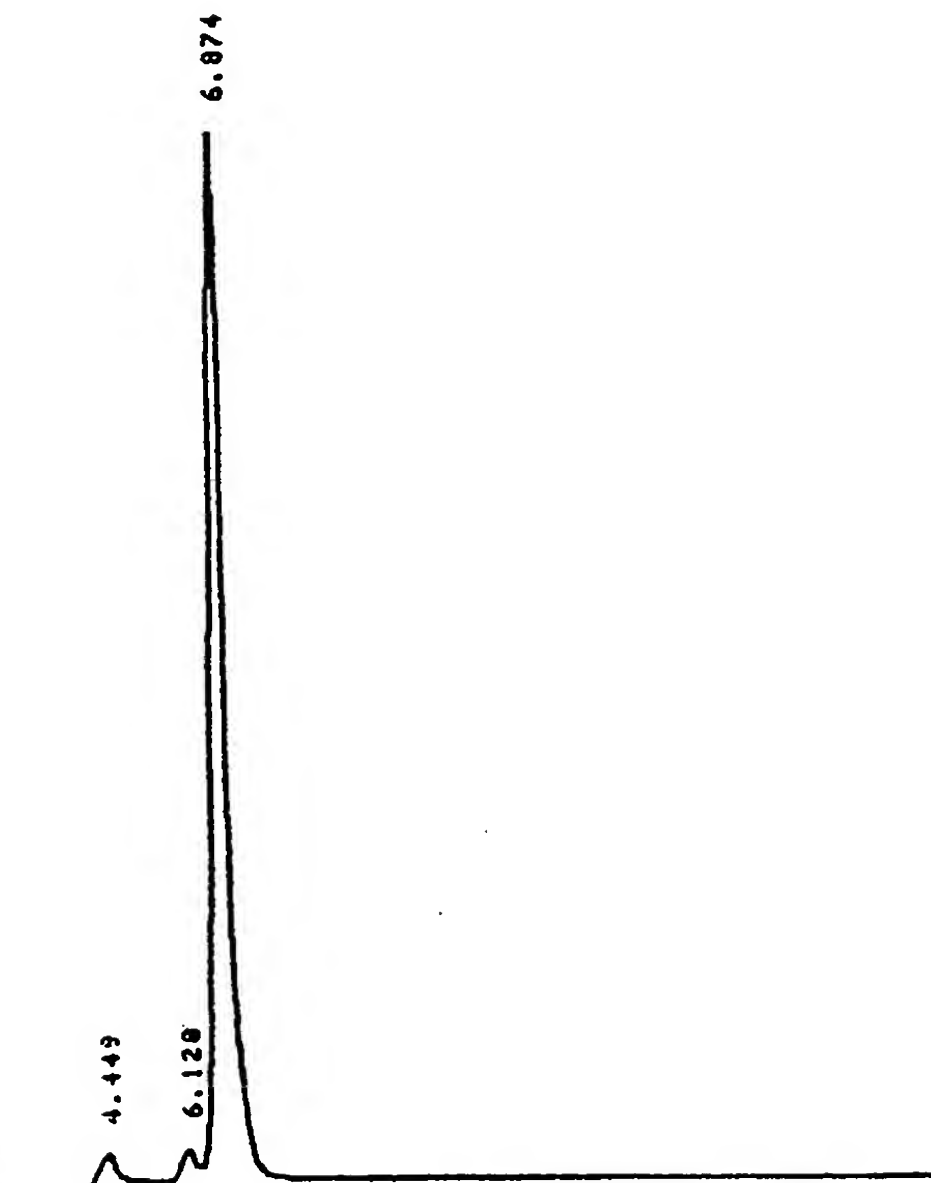
1/4

Fig. 1A

RUN# 101 MAR 6. 1901. 23:50:55

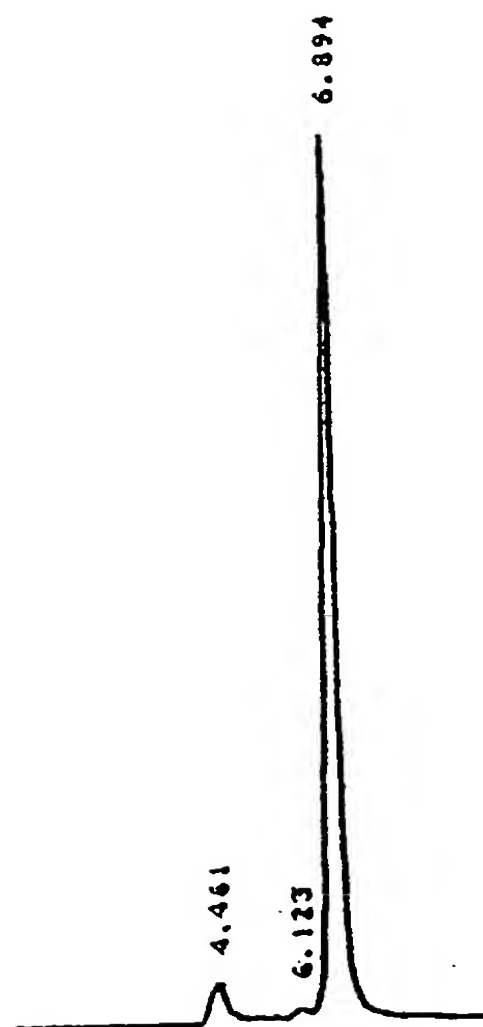
AREA#	RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA#
	4.461	746394	PV	.413	6.00296
	6.123	234060	VH	.366	1.90754
	6.894	11209792	ISHP	.271	92.00950

TOTAL AREA=1.2270E+07
MUL FACTOR=1.0000E+00



2/4

Fig. 1B



STOP

3/4

Fig. 2A

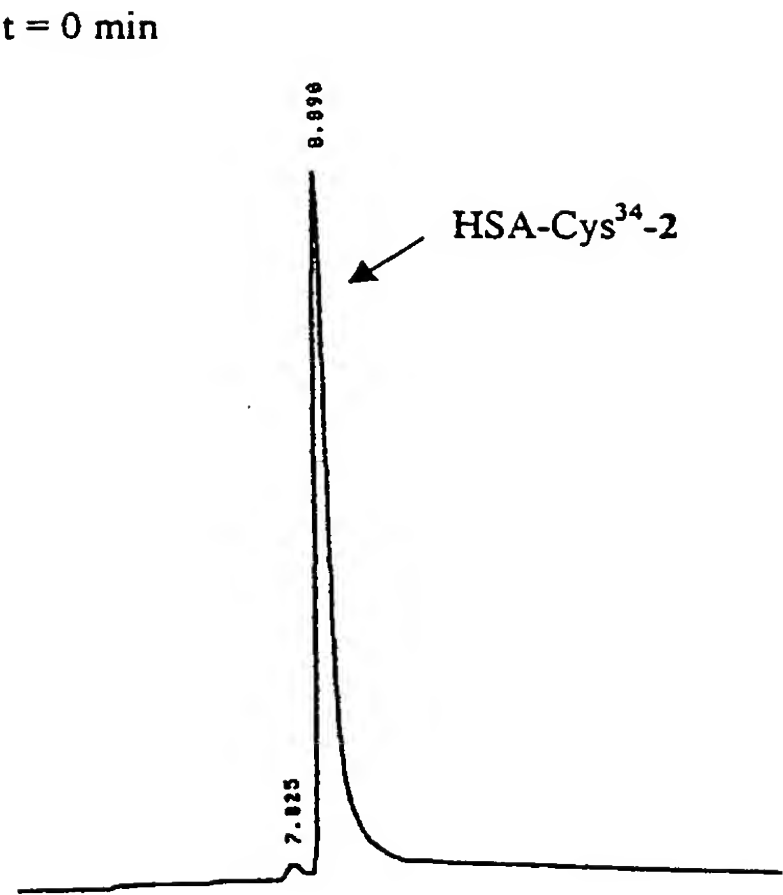
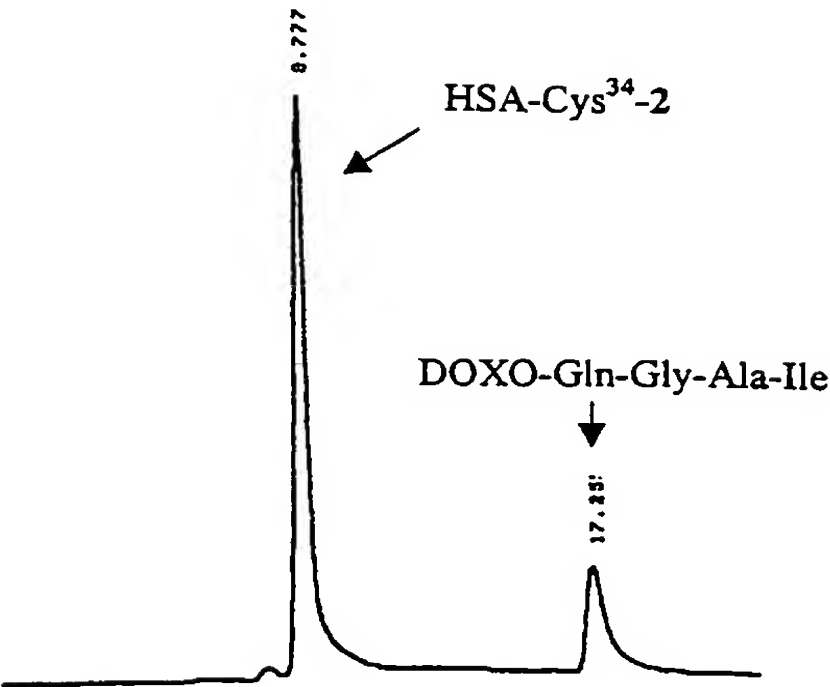


Fig. 2B

t = 30 min



4/4

Fig. 3A

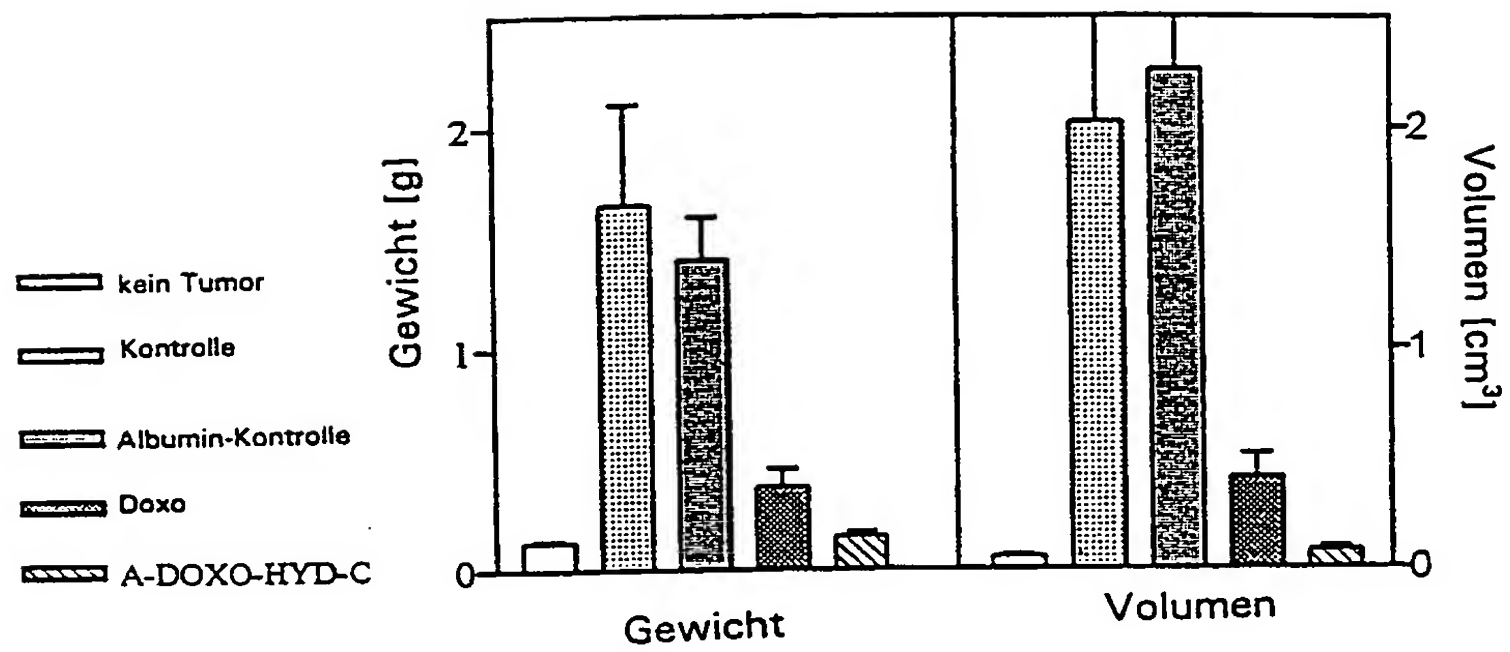
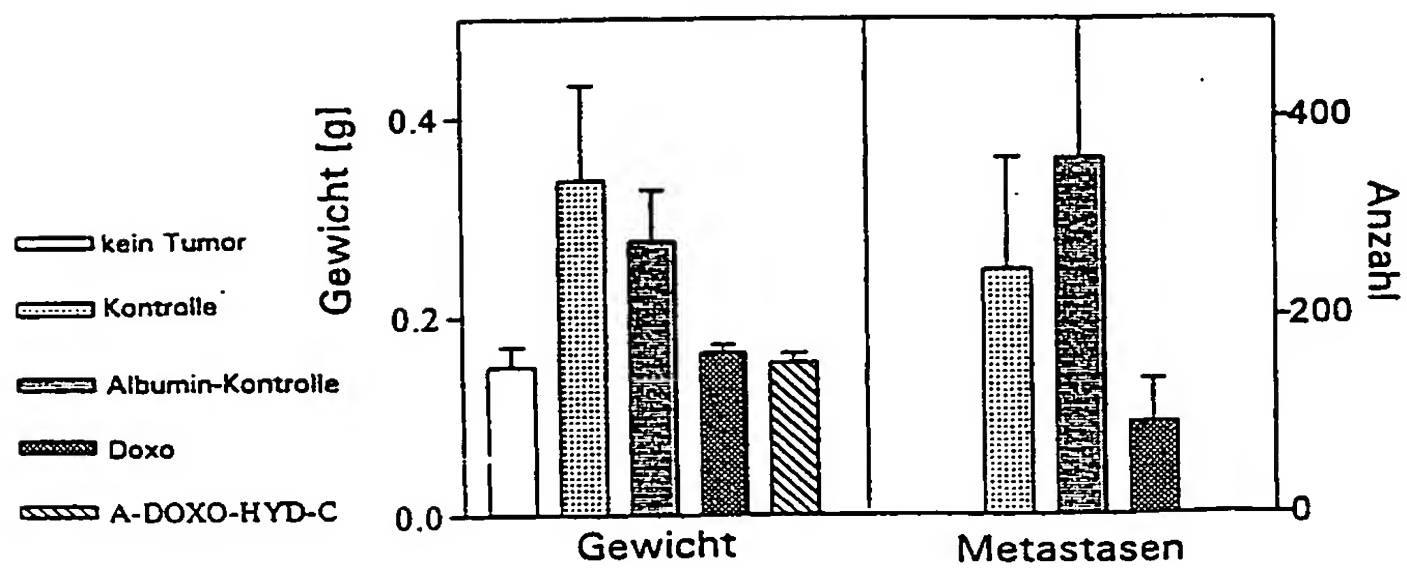


Fig. 3B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/EP 00/05254

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 196 36 889 A (KRATZ FELIX DR) 12 March 1998 (1998-03-12) cited in the application page 3, line 18 - line 28; claims ---	1-18
Y	KRATZ F ET AL: "PREPARATION, CHARACTERIZATION AND IN VITRO EFFICACY OF ALBUMIN CONJUGATES OF DOXORUBICIN" BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN (OF JAPAN), JP, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, vol. 21, no. 1, 1998, pages 56-61, XP000738275 ISSN: 0918-6158 figure 1 ----- -/--	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 March 2001

Date of mailing of the international search report

23/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No

PCT/EP 00/05254

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 00 76551 A (KRATZ FELIX ;KTB TUMORFORSCHUNGS GMBH (DE)) 21 December 2000 (2000-12-21) page 17, line 18 - line 26; claims	1
X	A. TROUET ET AL.: "A covalent linkage between daunorubicin and proteins that is stable in serum and reversible by lysosomal hydrolases, as required for a lysosomotropic drug-carrier conjugate; In vitro and in vivo studies." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 79, January 1982 (1982-01), pages 626-629, XP002162367 WASHINGTON US	1
Y	figure 1; table 1	1-18
Y	S. NETZEL-ARNETT: "Comparative sequence specificities of human 72- and 92-kDa gelatinases (type iv Collagenases) and PUMP (Matrilysin)" BIOCHEMISTRY, vol. 32, no. 25, 1993, pages 6427-6432, XP002162368 EASTON, PA US cited in the application table 1	1-18
A	M. NICHIFOR ET AL.: "Macromolecular prodrugs of 5-fluorouracil. 2: Enzymatic degradation." JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 39, 1996, pages 79-92, XP002162369 AMSTERDAM NL abstract; figure 1; table 1	1
A	G. M. DUBOWCHIK ET AL.: "Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs. 1. A model study of structural requirements for efficient release of doxorubicin." BIOORG MED CHEM LETT., vol. 8, no. 23, December 1998 (1998-12), pages 3341-3346, XP002162370 page 3342; table 1	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/05254

Continuation of Field I.2

Relevant Patent Claim Nos. 1-12 relate to an excessively large number of possible compounds/products/devices/methods. In fact, they comprise so many alternatives and possible permutations that they appear, in the given context, unclear (and/or too lengthy) under the terms of PCT Article 6 as if they enabled a meaningful search. For this reason, the search was directed at the sections of the patent claims which can be regarded as clear (and/or concise), namely the example.

The applicant is therefore advised that patent claims or sections of patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). Similar to the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO also does not generally carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the case when the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19), or in the case when the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/05254

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19636889 A	12-03-1998	AU 4548997 A WO 9810794 A EP 0934081 A JP 2001500133 T	02-04-1998 19-03-1998 11-08-1999 09-01-2001
WO 0076551 A	21-12-2000	DE 19926154 A	14-12-2000

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2682 - py	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/05254	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/06/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 10/06/1999
Anmelder KTB TUMORFORSCHUNGSGESELLSCHAFT MBH		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.



WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 1-12 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen/Produkte/Vorrichtung/Verfahren. In der Tat umfassen sie so viele Wahlmöglichkeiten, und mögliche Permutationen daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar (und/oder zu weitläufig gefasst) erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichen. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, die als klar (und/oder knapp gefaßt) gelten können, nämlich das Beispiel.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 00/05254

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 196 36 889 A (KRATZ FELIX DR) 12. März 1998 (1998-03-12) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeile 18 - Zeile 28; Ansprüche ---	1-18
Y	KRATZ F ET AL: "PREPARATION, CHARACTERIZATION AND IN VITRO EFFICACY OF ALBUMIN CONJUGATES OF DOXORUBICIN" BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN (OF JAPAN), JP, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, Bd. 21, Nr. 1, 1998, Seiten 56-61, XP000738275 ISSN: 0918-6158 Abbildung 1 --- -/--	1-18



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. März 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Berte, M



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
E	WO 00 76551 A (KRATZ FELIX ;KTB TUMORFORSCHUNGS GMBH (DE)) 21. Dezember 2000 (2000-12-21) Seite 17, Zeile 18 - Zeile 26; Ansprüche ---	1
X	A. TROUET ET AL.: "A covalent linkage between daunorubicin and proteins that is stable in serum and reversible by lysosomal hydrolases, as required for a lysosomotropic drug-carrier conjugate; In vitro and in vivo studies." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 79, Januar 1982 (1982-01), Seiten 626-629, XP002162367 WASHINGTON US Abbildung 1; Tabelle 1 ---	1
Y	Abbildung 1; Tabelle 1 ---	1-18
Y	S. NETZEL-ARNETT: "Comparitive sequence specificities of human 72- and 92-kDa gelatinases (type iv Collagenases) and PUMP (Matrilysin)" BIOCHEMISTRY, Bd. 32, Nr. 25, 1993, Seiten 6427-6432, XP002162368 EASTON, PA US in der Anmeldung erwähnt Tabelle 1 ---	1-18
A	M. NICHIFOR ET AL.: "Macromolecular prodrugs of 5-fluorouracil. 2: Enzymatic degradation." JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, Bd. 39, 1996, Seiten 79-92, XP002162369 AMSTERDAM NL Zusammenfassung; Abbildung 1; Tabelle 1 ---	1
A	G. M. DUBOWCHIK ET AL. : "Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs. 1. A model study of structural requirements for efficient release of doxorubicin." BIOORG MED CHEM LETT., Bd. 8, Nr. 23, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 3341-3346, XP002162370 Seite 3342; Tabelle 1 -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP00/05254

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19636889 A	12-03-1998	AU 4548997 A	02-04-1998
		WO 9810794 A	19-03-1998
		EP 0934081 A	11-08-1999
		JP 2001500133 T	09-01-2001
WO 0076551 A	21-12-2000	DE 19926154 A	14-12-2000

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 196 36 889 A (KRATZ FELIX DR) 12. März 1998 (1998-03-12) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeile 18 - Zeile 28; Ansprüche ---	1-18
Y	KRATZ F ET AL: "PREPARATION, CHARACTERIZATION AND IN VITRO EFFICACY OF ALBUMIN CONJUGATES OF DOXORUBICIN" BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN (OF JAPAN), JP, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, Bd. 21, Nr. 1, 1998, Seiten 56-61, XP000738275 ISSN: 0918-6158 Abbildung 1 --- -/--	1-18

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. März 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23/03/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Berte, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
E	WO 00 76551 A (KRATZ FELIX ;KTB TUMORFORSCHUNGS GMBH (DE)) 21. Dezember 2000 (2000-12-21) Seite 17, Zeile 18 - Zeile 26; Ansprüche ---	1
X	A. TROUET ET AL.: "A covalent linkage between daunorubicin and proteins that is stable in serum and reversible by lysosomal hydrolases, as required for a lysosomotropic drug-carrier conjugate; In vitro and in vivo studies." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 79, Januar 1982 (1982-01), Seiten 626-629, XP002162367 WASHINGTON US	1
Y	Abbildung 1; Tabelle 1 ---	1-18
Y	S. NETZEL-ARNETT: "Comparative sequence specificities of human 72- and 92-kDa gelatinases (type iv Collagenases) and PUMP (Matrilysin)" BIOCHEMISTRY, Bd. 32, Nr. 25, 1993, Seiten 6427-6432, XP002162368 EASTON, PA US in der Anmeldung erwähnt Tabelle 1 ---	1-18
A	M. NICHIFOR ET AL.: "Macromolecular prodrugs of 5-fluorouracil. 2: Enzymatic degradation." JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, Bd. 39, 1996, Seiten 79-92, XP002162369 AMSTERDAM NL Zusammenfassung; Abbildung 1; Tabelle 1 ---	1
A	G. M. DUBOWCHIK ET AL.: "Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs. 1. A model study of structural requirements for efficient release of doxorubicin." BIOORG MED CHEM LETT., Bd. 8, Nr. 23, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 3341-3346, XP002162370 Seite 3342; Tabelle 1 ---	1-18

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 1-12 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen/Produkte/Vorrichtung/Verfahren. In der Tat umfassen sie so viele Wahlmöglichkeiten, und mögliche Permutationen daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar (und/oder zu weitläufig gefasst) erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichen. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, die als klar (und/oder knapp gefaßt) gelten können, nämlich das Beispiel.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

INTERNATION R RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05254

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19636889 A	12-03-1998	AU 4548997 A	02-04-1998
		WO 9810794 A	19-03-1998
		EP 0934081 A	11-08-1999
		JP 2001500133 T	09-01-2001
WO 0076551 A	21-12-2000	DE 19926154 A	14-12-2000

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference K 2682 - PY	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/05254	International filing date (day/month/year) 07 June 2000 (07.06.00)	Priority date (day/month/year) 10 June 1999 (10.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 47/48		
Applicant KTB TUMORFORSCHUNGSGESELLSCHAFT MBH		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>10</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>3</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input checked="" type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 19 December 2000 (19.12.00)	Date of completion of this report 17 September 2001 (17.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/05254

I. Basis of the report**1. With regard to the elements of the international application:***

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-28, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 18, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 1-17, filed with the letter of 27 August 2001 (27.08.2001)
- ☒ the drawings:
pages 1/4-4/4, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☒ the claims, Nos. 18
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

Amendments (PCT Article 41)

The applicant submitted new Claims 1 to 17 with the letter of 27 August 2001.

The new Claim 1 is a combination of the original Claims 1 and 3. The term "cysteine radical" is mentioned in the new Claims 1 and 11. The other new Claims 2 to 10 and 12 to 17 correspond, respectively, to the original Claims 2, 4 to 10 and 13 to 18.

The amendments meet the requirements of PCT Article 41.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

ational application No.

PCT/EP00/05254

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:

☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

See Supplemental Sheet

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/05254

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II

Priority (PCT Article 8)

The priority of the application DE 19926475.9 was duly claimed for the present application.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/05254

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 1-10 In Part

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 1-10 In Part

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/05254

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

No preliminary examination

See international search report.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	2-4, 8, 16, 17	YES
	Claims	1, 5-7, 9-15	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-17	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Clarification (PCT Rule 66(2))

Subject matter of the present application

The present application discloses conjugates that contain a carrier (polypeptide) and a pharmakon (active substance and spacer molecule), characterized in that the pharmakon is bound to one or more of the free cysteine radicals of the carrier with an efficiency of more than 70%.

Cited documents (PCT Rule 64(1))

D1: DE-A-19 636 889

D2: KRATZ ET AL. (1998) BIOL. PHARM. BULL. 21, 56-61

D3: WO-A-00/76551 (filing date 07 June 2000, priority date 09 June 1999)

D4: TROUET ET AL. (1982) PNAS, USA 79, 626-629

D5: NETZEL-ARNETT (1993) BIOCHEMISTRY 32, 6427-6432

D6: NICHIFOR ET AL. (1996): J.CONTROLLED RELEASE 39, 79-92

D7: DUBOWCHIK ET AL. (1998) BIOORG. MED. CHEM. LETT. 8, 3341-3346.

D3 was submitted on the same day as the present application, but claims an earlier priority date than the present application. D3 therefore does not belong to the prior art under PCT Rule 64(1).

The following documents were added by the examiner:

D8: WO-A-93/08842

D9: Derossi et al. (1998) Trends in Cell Biol. 8, 84-87

D10: Narazaki et al. (1997) BBA 1338, 275-281.

Novelty (PCT Article 33(2))

D1 is from the inventor of the present application. The content of that document must therefore be well known to the applicant.

D2 is also from the inventor of the present application. The examiner would therefore like draw the applicant's attention to a few important points in D2. D2 discloses in Figure 1 the general structure of conjugates that contain a carrier, a pharmakon, a spacer and a cleavable linker. Acidic labile groups or groups that can be enzymatically cleaved are preferred as cleavable linkers. D2 describes doxorubicin as a pharmakon. In Figure 7, for example, a maleimide doxorubicin derivative is described. It is known that maleimide compounds react with free thiol groups. PEG, albumin (HSA) and monoclonal antibodies (mAb) are mentioned in D2 as examples of polymer carriers. The conjugation of the mAbs BR64 and BR96 with the aforementioned maleimide doxorubicin derivatives is described on pages 254-256. Two different methods for producing them are described in D11 (Willner et al. (1993) Bioconjugate Chem. 4, 521-527) and D12 (Firestone et al. (1996) J. Contr. Rel. 39, 251-259). The first method is comparable to that of D1 (see Fig. 1, D12). Free thiol groups are introduced by means of chemical modification of the active side chains (Lys) with SDPD. These chemically thiolated mAbs can react to the aforementioned maleimide doxorubicin derivatives in this way. The second method is comparable to the method according to the present application (see Fig. 2, D12). The mAb is treated with DTT

and the free SH groups created in this manner react directly with the maleimide doxorubicin derivatives. The analysis of the two methods in D12 (see in particular Point 3.3 'Uniformity of thiolation') is also interesting. Fig. 2 shows that mAb-Dox conjugates of the chemically thiolated mAb have a wide distribution of the molecular weight. In contrast to that, the mA-Dox conjugates of reduced mAb have a smaller, more ideal distribution of the molecular weight.

The mAb-Dox conjugates in D2 (D11 and D12) and the method for producing them (D11 and D12) are regarded as prejudicial to the novelty of Claims 1, 5 to 7 and 9 to 15.

D4 discloses an albumin doxorubicin conjugate for treating cancer-related illnesses (leukemia). Doxorubicin is bound to free NH₂ groups of albumin by a polypeptide spacer.

D8 discloses hemoglobin as a carrier for pharmacons. D8 discloses that hemoglobin is preferred to albumin, since it has only one free cysteine radical which can form a disulfide bond with a pharmacon.

D9, and the documents cited therein, disclose polypeptides which traverse (translocate) membranes and can be used to transport active substances to the inner part of the cell (cytoplasm). The bond between the carrier and the active substance can be a simple disulfide bond (see Table 1).

D10, and the documents cited therein, disclose the bonding of a fluorescence group (acrylodan) to albumin. D10 discloses that albumin has only one free cysteine radical (Cys-34, see A-DOXO-HYD-C (page 25) and HSA-Cys³⁴-2 (page 27)) and that this SH group is very reactive owing to a low pK_{SH}.

Inventive Step (PCT Article 33(3))

The concept according to the present application, i.e. increasing the therapeutic index of drugs by means of conjugation with polymer carriers, has been known for a long time. It is known in particular that pharmacons have a longer lifetime (purification) when they are bound to a carrier such as albumin.

Acid- or protease-labile linkers or spacers are known to a person skilled in the art (see D2, D4 and Kratz et al (1999) Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 16, 245-288). It is therefore obvious that polypeptide spacers can be designed which are 'specific' to proteases or membrane proteins that characterize a possible target.

The present application differs from D1 only in that 'Cys-reduced' albumin instead of 'thiolated' albumin is used. Proceeding from D2 and D12, this modification of D1 is very obvious. Furthermore, D10 discloses that albumin, contrary to what is taught in D8, has only one free SH group. Therefore, none of the claims presently appears to be inventive.

It is presently not discernable what part of the application could form the basis for a new, allowable claim. If the applicant still considers an individual subject matter to be patentable, the applicant should submit an independent claim that is directed to that subject matter. The difference between the subject matter of the new claim and the prior art as well as the meaning of this difference should be specified in a written response.

Industrial applicability (PCT Article 33(4))

The conjugates of the present application can be used as medicine.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

Cited documents (PCT Rule 64(3))

The applicant should be aware that D3 may be regarded as prior art when the present application enters the European phase. D3 discloses in Example 5, for example, the albumin doxorubicin conjugate HSA-Cys³⁴-2 (pages 29-31).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Observations regarding the claims (PCT Article 6)

Claim 1 is not supported by the description (PCT Article 6), since its scope goes beyond the scope justified by the description and the drawings. The reason for this is as follows: only albumin (HSA) is used in the example, but Claim 1 includes all known and unknown proteins.

The new Claim 10 contains a typing error. This claim should refer to Claims 1 to 9, not 1 to 19.

VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 19 SEP 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT PCT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2682	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/05254	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/06/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 10/06/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K47/48		
Anmelder KTB TUMORFORSCHUNGSGESELLSCHAFT MBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 10 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
 - ☒ Grundlage des Berichts
 - ☒ Priorität
 - ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
 - ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 19/12/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 17.09.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Vogt, T Tel. Nr. +49 89 2399 8477 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-28 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

18 ursprüngliche Fassung

1-17 eingegangen am 27/08/2001 mit Schreiben vom 27/08/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- | | | | |
|-------------------------------------|---------------|---------|----|
| <input type="checkbox"/> | Beschreibung, | Seiten: | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Ansprüche, | Nr.: | 18 |
| <input type="checkbox"/> | Zeichnungen, | Blatt: | |

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:

- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
- ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.

2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 1-10 partly.

Begründung:

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
 - ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
 - ☒ Für die obengenannten Ansprüche Nr. 1-10 partly wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:
- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
 - ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	2-4, 8, 16 und 17.
	Nein: Ansprüche	1, 5-7 und 9-15.
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-17.
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-17.
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/05254

siehe Beiblatt

I Änd rungen (Art. 41 PCT).

Die Anmelderin hat mit dem schreiben von 27.08.2001 neue Ansprüche 1-17 eingereicht.

Der neue Anspruch 1 ist eine Kombination der ursprünglichen Ansprüche 1 und 3. Der Ausdruck "cystein-rest" ist in den neuen Ansprüchen 1 und 11 erläutert worden. Die weiteren neuen Ansprüche 2-10 und 12-17 entsprechen den ursprünglichen Ansprüchen 2, 4-10 und 13-18.

Die Änderungen entsprechen Art. 41 PCT.

II Priorität (Art. 8 PCT).

Die Priorität der Anmeldung DE 19926475.9 wurde für die vorliegende Anmeldung rechtmäßig beansprucht.

III Keine vorläufige Prüfung.

Siehe Internationaler Rechenbericht.

V Erklärung (Regel 66(2) PCT).

Gegenstand der derzeitige Anmeldung.

Die vorliegende Anmeldung offenbart Konjugate, enthaltend einen Träger (Polypeptide) und ein Pharmakon (aktive Substanz und Spacermolekül), dadurch gekennzeichnet daß das Pharmakon mit einer Effizienz von über 70% an einen oder mehrere der freien Cystein-Reste des Trägers gebunden ist.

Zitierte Dokumente (Regel 64(1) PCT).

D1: DE-A-19636889.

D2: KRATZ ET AL (1998) BIOL. PHARM. BULL. 21, 56-61.

D3: WO-A-0076551. (Anmeldedatum 07.06.2000, Prioritätsdatum 09.06.1999).

D4: TROUET ET AL. (1982) PNAS, USA 79, 626-629.

D5: NETZEL-ARNETT (1993) BIOCHEMISTRY 32, 6427-6432.

D6: NICHIFOR ET AL. (1996): J. CONTROLLED RELEASE 39, 79-92.

D7: DUBOWCHIK ET AL. (1998) BIOORG. MED. CHEM. LETT. 8, 3341-3346.

D3 wurde am gleichen Tag wie die vorliegende Anmeldung eingereicht, beansprucht aber ein früheres Prioritätsdatum als die vorliegende Anmeldung. Damit gehört D3 nicht zum Stand der Technik gemäss Regel 64(1) PCT.

Folgende Dokumente werden vom Prüfer eingeführt.

D8: WO-A-9308842.

D9: Derossi et al. (1998) Trends in Cell Biol. 8, 84-87.

D10: Narazaki et al. (1997) BBA 1338, 275-281.

Neuheit (Art. 33(2) PCT).

D1 ist vom Erfinder der vorliegenden Anmeldung. Der Inhalt dieses Dokuments sollte die Anmelderin somit bekannt sein.

D2 ist ebenfalls vom Erfinder der vorliegenden Anmeldung. Dennoch möchte der Prüfer die Anmelderin auf einige wichtige Punkte in D2 hinweisen. D2 offenbart in Abb. 1 die generelle Struktur von Konjugaten enthaltend einen Träger, ein Pharmakon, einen Spacer und einen spaltbare Linker. Als spaltbare Linker werden säure labile Gruppen oder Gruppen die enzymatisch gespaltet werden können, bevorzugt. Als Pharmakon beschreibt D2 Doxorubicin. In Abb. 7 zum Beispiel wird ein Maleimid-Doxorubicin Derivat beschrieben. Von maleimiden Verbindungen ist es bekannt daß sie mit freien Thiolgruppen reagieren. Als Beispiele für polymere Träger werden in D2 PEG, Albumin (HSA) und monoklonale Antikörper (mAb) genannt. Auf den Seiten 254-256 wird die Konjugierung von mAb's BR64 und BR96 mit den obengenannten Maleimide-Doxorubicin Derivaten beschrieben. Zwei unterschiedliche Methoden zu deren Herstellung werden in D11 beschrieben (Willner et al. (1993) Bioconjugate Chem. 4, 521-527) und D12 (Firestone et al. (1996) J. Controll. Rel. 39, 251-259). Die erste Methode ist vergleichbar mit der von D1 (Siehe Schema 1, D12). Freie thiol Gruppen werden durch chemische Modifizierung der aktiven Seitenketten (Lys) mit SDPD eingeführt. Diese chemisch thiolisierte mAb können so mit den obengenannten maleimid-Doxorubicin Derivaten reagieren. Die zweite Methode ist vergleichbar mit der Methode aus der vorliegenden Anmeldung (siehe Schema 2, D12). Das mAb wird mit DTT behandelt und die so entstandene freie SH Gruppen reagieren direkt mit den Maleimid-Doxorubicin Derivaten. Interessant ist ebenso die Analyse der beiden

Methoden in D12 (siehe insbesondere Punkt 3.3 'Uniformity of thiolation'). Abb. 2 zeigt, daß mAb-Dox Konjugate von dem chemisch thiolisierte mAb eine breite Distribution des Molekulargewichts haben. In Gegensatz dazu haben die mAb-Dox Konjugate von reduziertem mAb eine geringere, idealere Distribution des Molekulargewichts. Die mAb-Dox Konjugate aus D2 (sowie D11 und D12) und das Verfahren zu deren Herstellung (D11 und D12) werden als neuheitschädlich für die Ansprüche 1, 5-7 und 9-15 angesehen.

D4 offenbart ein Albumin-Doxorubicin Konjugate zur Behandlung von Krebs Erkrankungen (Leukämie). Doxorubicin ist durch ein Polypeptidspacer an freie NH_2 Gruppen von Albumin gebunden.

D8 offenbart Hämoglobin als Träger für Pharmaka. D8 offenbart, daß Hämoglobin gegenüber Albumin bevorzugt wird, weil es nur einen freien Cystein-Rest hat das mit einem Pharmakon eine Disulfid Bindung binden kann.

D9, und die darin zitierten Dokumenten, offenbaren Polypeptide, die Membranen durchqueren (translokieren) und benutzt werden können, um aktive Substanzen ins Zellinnere (cytoplasma) zu transportieren. Die Bindung zwischen Träger und aktiver Substanz kann eine einfache disulfid Bindung sein (siehe Tabelle 1).

D10, und die darin zitierten Dokumenten, offenbaren die Kupplung einer Fluoreszenzgruppe (acrylodan) an Albumin. D10 offenbart, daß Albumin nur einen freien Cystein-Rest hat (Cys-34, siehe A-DOXO-HYD-C (S. 25) und HSA-Cys³⁴-2 (S. 27)) und daß diese SH Gruppe durch einen niedrigen pK_{SH} sehr reaktiv ist.

Erfinderische Tätigkeit (Art. 33(3) PCT).

Das Konzept der vorliegenden Anmeldung, den therapeutischen Index von Arzneimittel mittels Konjugierung mit polymeren Träger zu erhöhen, ist seit langem bekannt. Es ist insbesondere bekannt, daß Pharmaka eine längere Lebenszeit (Klärung) haben, wenn sie an einen Träger, wie zum Beispiel Albumin, verbunden sind.

Säure- oder Protease-labile Linker oder Spacers sind dem Fachmann bekannt (siehe D2, D4 und Kratz et al. (1999) Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 16, 245-288). Daher erscheint es naheliegend, daß Polypeptidspacers entworfen

werden können die für Proteasen oder Membranproteine die ein mögliches Ziel charakterisieren, 'spezifisch' sind.

Die derzeitige Anmeldung unterscheidet sich von D1 nur darin, daß nicht 'thiolysiertes' Albumin, sondern 'Cys-reduziertes' Albumin, benutzt wird. Ausgehend von D2 und D12 wird diese Modifizierung von D1 sehr nahegelegt. Desweiteren offenbart D10, daß Albumin, im Gegensatz zu dem was in D8 behauptet wird, nur eine freie SH gruppe hat. Daher erscheint keiner der Ansprüche zum gegenwärtigen Zeitpunkt als erfinderisch.

Gegenwärtig ist nicht erkennbar, welcher Teil der Anmeldung die Grundlage für einen neuen, gewährbaren Anspruch bilden könnte. Sollte der Anmelder dennoch einen einzelnen Gegenstand als patentfähig ansehen, so sollte ein auf diesen Gegenstand gerichteter, unabhängiger Anspruch eingereicht werden. Im Antwortschreiben sollte einerseits der Unterschied zwischen dem Gegenstand des neuen Anspruchs und dem Stand der Technik und andererseits die Bedeutung dieses Unterschiedes angegeben werden.

Gewerbliche Anwendbarkeit (Art. 33(4) PCT).

Die Konjugate der derzeitigen Anmeldung sind als Arzneimittel benutzbar.

VI Zitierte Dokumenten (Regel 64(3) PCT).

Die Anmelderin muß damit rechnen, daß D3 Stand der Technik werden kann, falls die vorliegende Anmeldung in die europäische Phase eintritt. D3 offenbart zum Beispiel in Beispiel 5 das Albumin-Doxorubicin Konjugate HSA-Cys³⁴-2 (S. 29-31).

VIII Bemerkungen in bezug auf die Ansprüche (Art. 6 PCT).

Der Anspruch 1 wird nicht, wie in Artikel 6 PCT vorgeschrieben, durch die Beschreibung gestützt, da sein Umfang über den durch die Beschreibung und die Zeichnungen gerechtfertigten Umfang hinausgeht. Die Gründe dafür sind die folgenden: in dem Beispiel wird nur Albumin (HSA) benutzt, Anspruch 1 dagegen umfaßt alle bekannte und unbekannte Proteine.

Die Anmelderin ist in dem neuen Anspruch 10 ein Tippfehler entgangen. Dieser Anspruch sollte auf die Ansprüche 1-10 verweisen, nicht jedoch auf die Ansprüche 1-19.

27. August 2001

Amtl. Aktenzeichen: PCT/EP00/05254

Anmelder: KTB Tumorforschungsgesellschaft mbH

"Träger-Pharmaka-Konjugate"

Unser Zeichen: K 2682 - py / js

Ansprüche

1. Träger-Pharmakon-Konjugat, umfassend einen Träger, enthaltend eine Polypeptidsequenz mit einem oder mehreren reduzierbaren Cystein-Resten, und ein Pharmakon, enthaltend eine pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz, ein Spacermolekül und eine thiolbindende Gruppe, wobei das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül hydrolytisch und/oder pH-abhängig und/oder enzymatisch spaltbar ist und pro Mol reduzierbarem Cystein-Rest mehr als 0,7 Mol Pharmakon über die thiolbindende Gruppe an den Cystein-Rest des Trägers gebunden sind.
2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei der Träger natives oder rekombinantes Albumin ist.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung mindestens eine Peptidbindung enthält.
4. Konjugat nach Anspruch 3, wobei die Peptidbindung innerhalb einer Peptidsequenz vorliegt, welche mindestens eine Spaltsequenz einer Protease enthält.
5. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung mindestens eine säurelabile Bindung enthält.
6. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die pharmazeutisch aktive Substanz ein Zytostatikum, ein Zytokin, ein Immunsuppressivum,

ein Antirheumatikum, ein Antiphlogistikum, ein Antibiotikum, ein Analgetikum, ein Virostatikum oder ein Antimykotikum ist.

7. Konjugat nach Anspruch 6, wobei das Zytostatikum aus der Gruppe der Anthrazykline, der N-Nitrosoharnstoffe, der Alkylantien, der Purin- oder Pyrimidinantagonisten, der Folsäureantagonisten, der Taxane, der Camptothecine, der Podophyllotoxinderivate, der Vinca-Alkaloide, der Calicheamicine, der Maytansinoide oder der *cis*-konfigurierten Platin(II)-Komplexe ausgewählt ist.
8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die diagnostisch wirksame Substanz ein oder mehrere Radionuklide, ein oder mehrere Radionuklide umfassende Liganden, ein oder mehrere Positronenstrahler, ein oder mehrere NMR-Kontrastmittel, eine oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder ein oder mehrere Kontrastmittel im nahen IR-Bereich enthält.
9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die thiolbindende Gruppe eine Maleinimidgruppe, eine Halogenacetamidgruppe, eine Halogenacetatgruppe, eine Pyridyldithio-Gruppe, eine Vinylcarbonylgruppe, eine Aziridingruppe, eine Disulfidgruppe oder eine Acetylengruppe umfaßt, die gegebenenfalls substituiert sind.
10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 19, wobei das Spacermolekül einen substituierten oder unsubstituierten, verzweigt- oder unverzweigt-kettigen aliphatischen Alkylrest mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen und/oder mindestens einen substituierten oder unsubstituierten Arylrest und/oder einen aliphatischen Kohlenstoffring mit 3 bis 12 Kohlenstoffatomen umfaßt.
11. Verfahren zur Herstellung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 10, umfassend
 - (i) Behandlung des Trägers mit einem Reduktionsmittel, so daß mehr

als 0,7 Mol, vorzugsweise mindestens 0,9 Mol, Cystein-SH-Gruppen pro Mol reduzierbarem Cystein-Rest im Träger vorliegen und
(ii) Kopplung des Pharmakons über die thiolbindende Gruppe an die Cystein-SH-Gruppen im Träger.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das Reduktionsmittel Dithiothreitol, Dithioerythritol oder Mercaptoethanol ist.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei das hergestellte Konjugat eine Reinheit von mehr als 95% aufweist.
14. Arzneimittel, enthaltend das Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder einen Hilfsstoff und/oder ein Verdünnungsmittel.
15. Arzneimittel nach Anspruch 14 zur Behandlung von Krebskrankheiten, Autoimmunkrankheiten, akuten oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Viren und/oder Mikroorganismen verursacht werden.
16. Diagnostischer Kit, enthaltend das Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
17. Kit nach Anspruch 16 zum Nachweis von Krebskrankheiten, Autoimmunkrankheiten, akuten oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Viren und/oder Mikroorganismen verursacht werden, und/oder von Molekülen des Trägers und/oder deren Verteilung im Körper.

REPLACED BY
ART 34 AMDT

Claims

1. Carrier-drug conjugate made up of a carrier, which contains a polypeptide sequence having one or a plurality of cysteine groups, and a drug, which contains a pharmaceutically and/or diagnostically active substance, a spacer molecule, and a thiol-binding group, more than 0.7 mol of drug per mol of cysteine group being bound to the carrier via the thiol-binding group.
2. Conjugate according to Claim 1, in which the carrier is native or recombinant albumin.
3. Conjugate according to Claim 1 or 2, in which the spacer molecule and/or the linkage between the pharmaceutically and/or diagnostically active substance and the spacer molecule and/or the linkage between the thiol-binding group and the spacer molecule is cleavable hydrolytically and/or in pH-dependent fashion and/or enzymatically.
4. Conjugate according to Claim 3, in which the spacer molecule and/or the linkage contains at least one peptide bond.
5. Conjugate according to Claim 4, in which the peptide bond lies within a peptide sequence that contains at least one cleavage sequence of a protease.
6. Conjugate according to one of Claims 3 to 5, in which the spacer molecule and/or the linkage contains at least one

YB 000A 127
1000 12 127

acid-labile bond.

7. Conjugate according to one of Claims 1 to 6, in which the pharmaceutically active substance is a cytostatic, a cytokine, an immunosuppressant, an antirheumatic, an antiphlogistic, an antibiotic, an analgesic, a virostatic or an antimycotic.

8. Conjugate according to Claim 7, in which the cytostatic is selected from the group of the anthracyclines, the N-nitrosoureas, the alkylating agents, the purine antagonists or pyrimidine antagonists, the folic acid antagonists, the taxanes, the camptothecins, the podophyllotoxin derivatives, the Vinca alkaloids, the calicheamicins, the maytansinoids or the cis-configured platinum(II) complexes.

9. Conjugate according to one of Claims 1 to 8, in which the diagnostically active substance contains one or a plurality of radionuclides, one or a plurality of ligands containing radionuclides, one or a plurality of positron emitters, one or a plurality of NMR contrast media, one or a plurality of fluorescing compound(s) or one or a plurality of contrast media in the near IR region.

10. Conjugate according to one of Claims 1 to 9, in which the thiol-binding group contains a maleinimide group, a haloacetamide group, a haloacetate group, a pyridyldithio group, a vinylcarbonyl group, an aziridine group, a disulfide group or



100

100

100

100

an acetylene group, which are substituted if appropriate.

11. Conjugate according to one of Claims 1 to 10, in which the spacer molecule is made up of a substituted or unsubstituted, branched-chain or straight-chain aliphatic alkyl group with 1 to 12 carbon atoms and/or at least one substituted or unsubstituted aryl group and/or an aliphatic carbon ring with 3 to 12 carbon atoms.

12. Method for the preparation of the conjugate according to one of Claims 1 to 11, including

- (i) treatment of the carrier with a reducing agent so that more than 0.7 mol, preferably at least 0.9 mol, of cysteine SH groups is present in the carrier per mol of cysteine group and
- (ii) coupling of the drug to the cysteine SH groups in the carrier via the thiol-binding group.

13. Method according to Claim 12, in which the reducing agent is dithiothreitol, dithioerythritol or mercaptoethanol.

14. Method according to Claim 12 or 13, in which the conjugate prepared exhibits a purity of more than 95%.

15. Medicament containing the conjugate according to one of Claims 1 to 11 and, if appropriate, a pharmaceutically compatible carrier and/or an auxiliary agent and/or a diluting agent.

16. Medicament according to Claim 15 for the treatment of



Page 1 of 1

cancer diseases, autoimmune diseases, acute or chronically inflammatory diseases and diseases that are caused by viruses and/or microorganisms.

17. Diagnostic kit containing the conjugate according to one of Claims 1 to 11.

18. Kit according to Claim 17 for the detection of cancer diseases, autoimmune diseases, acute or chronically inflammatory diseases and diseases that are caused by viruses and/or microorganisms, and/or of molecules of the carrier and/or of its distribution in the body.



1000